

La diagnosi molecolare del carcinoma vescicale: un aiuto per la prognosi e la terapia.**Molecular diagnosis of Vesical Cancer: a help for prognosis and therapy**

Dr. Silvana Virgilio, Biologa ad indirizzo fisiopatologico, Trapani
E-mail: silvi.virgilio@libero.it

Abstract

L'avanzamento delle conoscenze della biologia molecolare dei tumori ha portato all'individuazione di marcatori bio-molecolari utili per la diagnosi, la prognosi e la terapia degli stessi. Il presente articolo evidenzia in particolare i markers coinvolti nella cancerogenesi vescicale. Il carcinoma alla vescica è il quarto tra i tumori più comuni nell'uomo seguito da quello alla prostata, al polmone, e al colon; la sua insorgenza dipende da una combinazione di fattori genetici e ambientali tra cui il fumo di sigaretta e gli elementi chimici usati nelle industrie. Il carcinoma a cellule transizionali, conosciuto anche come uroteliale, rappresenta il 90% di tutti i tumori primitivi di quest'organo. Il suo sviluppo può essere esofitico, endofitico o una combinazione di entrambi. Inoltre l'Organizzazione Mondiale della Sanità e la Società Internazionale di Urologia hanno stilato una classificazione di tale carcinoma in base ai diversi gradi e stadi di invasività tumorale. Nel presente lavoro si riassumono tutti i markers del carcinoma alla vescica che predicano la ricorrenza del tumore, la progressione e lo sviluppo di metastasi. The International Consensus Panel ha stilato una classifica di tali markers raggruppandoli in 6 classi: 1) markers associati ai microsatelliti, 2) proto-oncogeni/oncogeni, 3) geni soppressori di tumori, 4) regolatori del ciclo cellulare, 5) fattori relativi all'angiogenesi e 6) molecole di adesione della matrice extracellulare. A questo elenco si potrebbe oggi aggiungere un'altra classe di markers che svolge un importante ruolo nella diagnosi e nella prognosi dei carcinomi: le heat shock proteins.

Parole chiave: carcinoma vescicale, diagnosi molecolare, proteine da shock termico
Keywords: bladder cancer, molecular diagnosis, heat shock proteins

CAPSULA EBURNEA, 1,9: 1-9, 2006.

Introduzione.

I notevoli progressi della biologia molecolare ci consentono di scrutare in modo sempre più dettagliato l'interno della cellula, di analizzarne i meccanismi che ne regolano la vita e che se sregolati possono essere alla base dello sviluppo del cancro. Di quest'ultimo, attualmente, si conoscono geni che se alterati producono proteine modificate (come il gene Rb o quello per la p53) le quali portano alla perdita dei normali meccanismi di regolazione del ciclo cellulare e alla proliferazione incontrollata della crescita cellulare. Tali geni alterati sono considerati markers utili per la diagnosi, la prognosi e la terapia tumorale. L'individuazione di tali markers è possibile tramite le nuove tecniche di biologia molecolare quale la metodica del microarray che ci consente di ottenere il profilo molecolare del tumore. Infatti, tramite tale tecnica, è possibile analizzare il trascrittoma di una cellula o di un tessuto al fine di conoscere quali sono i geni che vengono alterati nella loro progressione dal normale al tumorale. Nel presente lavoro esamineremo in particolare i nuovi markers coinvolti

nella cancerogenesi vescicale

Anatomia clinica della vescica

La vescica è un organo cavo, appartenente alle vie urinarie che si trova nella pelvi; fa seguito agli ureteri, che vi riversano l'urina prodotta dal rene e si continua con l'uretra. La parete della vescica è costituita da tre strati dall'interno all'esterno: la mucosa, la muscolare propria e l'avventizia o sierosa. In particolare, nella mucosa l'epitelio di rivestimento è un epitelio di transizione che poggia sulla lamina propria (fig. 1).

L'urotelio è un epitelio pavimentoso stratificato particolare, caratteristico delle vie urinarie, costituito da elementi cellulari la cui forma e la cui altezza varia al variare del grado di distensione della parete, grazie alla plasticità che li caratterizza. In condizioni di riposo, esso appare costituito da cellule dello strato profondo, di forma ovale, da cellule dello strato intermedio, di forma "a clava", per il sottile e lungo prolungamento di cui sono provviste che si insinua tra le cellule sottostanti e cellule superficiali, a volte binucleate, voluminose

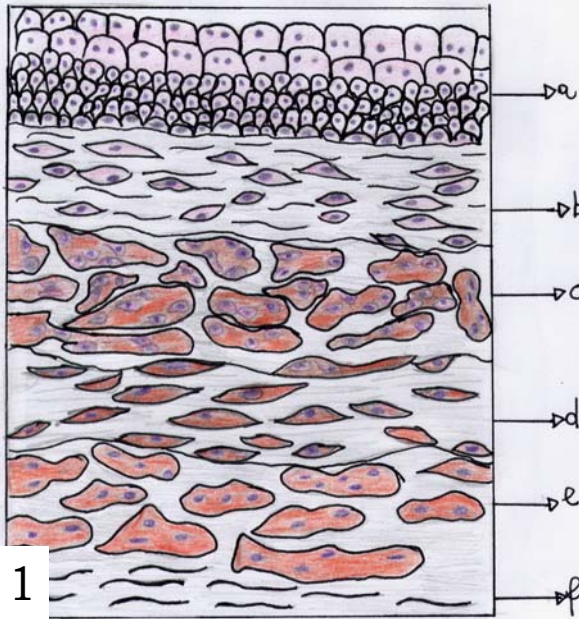
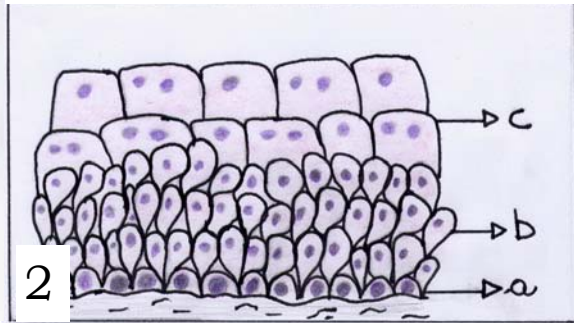


Figura 1: Parete della vescica; a) epitelio, b) lamina propria, c) muscolare interna, d) muscolare intermedia, e) muscolare esterna, f) sierosa.

Figura 2: Tipi di cellule presenti nell'epitelio vescicale; a) cellule di forma ovoidale, b) cellule a clava, c) cellule ad ombrello.



e appiattite, anche definite cellule “ad ombrello” (fig. 2).

Carcinoma vescicale: incidenza e mortalità

Il carcinoma alla vescica è il quarto tra i tumori più comuni nell'uomo seguito da quello alla prostata, al polmone e al colon. La maggior parte dei casi di tale carcinoma si riscontra in pazienti di età compresa tra i 65 e i 70 anni, anche se raramente può insorgere in giovani e in bambini. Inoltre, si è riscontrata una maggiore incidenza di tale patologia negli uomini, piuttosto che nelle donne, infatti il rischio di sviluppo del tumore alla vescica in età minore di 75 anni è del 2 al 4% negli uomini e del 0.5 al 1% nelle donne (1) (fig 3)

Non è stato ancora ben chiarito il motivo di tale differenza, ma da esperimenti condotti su ratti si è visto che gli androgeni, a differenza degli estrogeni, contribuiscono positivamente allo sviluppo del carcinoma alla vescica (2). Inoltre, nelle donne in gravidanza la percentuale di rischio diminuisce a causa dei cambiamenti ormonali tipici di tale periodo (3). Infatti nelle donne Afro-Americane il rischio di sviluppo del tumore è pari a metà di quello delle donne Occidentali ma di contro queste hanno un indice di sopravvivenza minore (4).

Fattori di rischio:

Come avviene solitamente in tutti i tumori, lo sviluppo del carcinoma alla vescica dipende da una combinazione di fattori genetici e ambientali. Il primo tra i fattori di rischio è il fumo da sigaretta che è la cau-

sa del 30%-50% di tutti i tumori di questo organo e porta ad un aumento della percentuale di rischio dal 2 al 4% (5). Inoltre, si pensa che alcuni fattori chimici utilizzati nelle industrie, come il 4-amminofenile, la benzidina e l'ortotoluidene giochino un ruolo di fondamentale importanza nello sviluppo del carcinoma alla vescica tanto da essere banditi dal mercato industriale. Anche la radioterapia è considerata come un fattore di rischio e confrontando pazienti sottoposti a radio o chemioterapia con pazienti che avevano subito un trattamento chirurgico si è visto che i primi avevano una maggiore probabilità nel contrarre il tumore rispetto ai secondi e che questa aumentava se i pazienti erano sottoposti ad entrambi (6).

Sono stati fatti degli studi per verificare l'ipotesi di una relazione tra il caffè (7,8) e i dolcificanti artificiali, le tinture per capelli (9) e l'aumento del tasso di mortalità per carcinoma alla vescica ma non si dimostrò nessuna associazione positiva. Inoltre, considerando che il tumore alla vescica è anche legato a fattori genetici, si è visto che il rischio di contrarre tale patologia raddoppia in presenza di casi familiari (10).

Classificazione del carcinoma a cellule transizionali (TCC) o carcinoma uroteliale:

Il carcinoma a cellule transizionali, conosciuto anche come carcinoma uroteliale, rappresenta circa il 90% di tutti i tumori primitivi di quest'organo. Il suo sviluppo

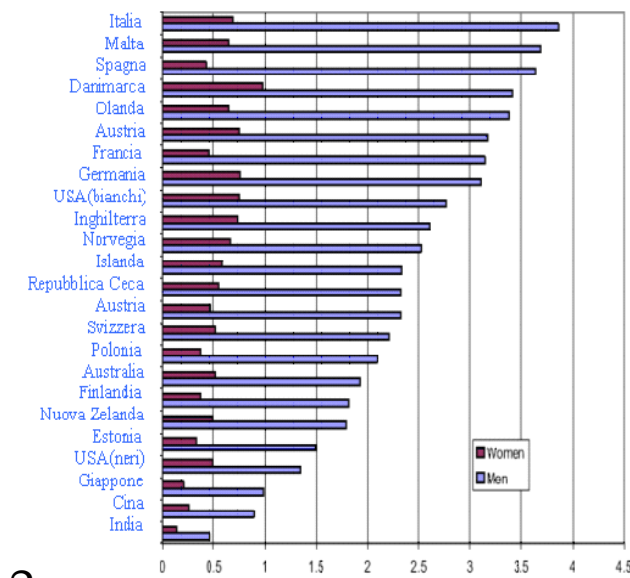
TABELLA 1: Classificazione del carcinoma uroteliale secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità e la Società Internazionale di Urologia

- Normale
- Normale*
- Iperplasia
- Iperplasia piatta
- Iperplasia papillare
- Lesioni piatte con atypia
- Reactive (infiammatorie) atypia
- Displasia
- Carcinoma in situ[^]
- Neoplasia papillare (Ta)
- Papilloma
- PUNLMP
- Carcinoma papillare di basso grado (NILGC)
- Carcinoma papillare di alto grado (NIHGIC)

PUNLMP = neoplasie uroteliali papillari di basso potenziale maligno

* Includere casi diagnosticati nel passato come leggere displasie

[^] Includere casi diagnosticati nel passato come gravi displasie



3

Figura 3: Rischio cumulativo di carcinoma alla vescica in pazienti di età minore ai 75 anni.

può essere esofitico, endofitico o una combinazione di entrambi. Quando è esofitico assume una configurazione papillare o apparentemente solida, quando è endofitico forma dei clusters di cellule nella mucosa. Con il termine "carcinoma in situ" (CIS) si intendono quelle lesioni tumorali di alto grado mostranti evidenti caratteristiche citologiche atipiche non aventi capacità invasiva nello stroma; queste si definiscono T0. Negli anni sono state proposte diverse classificazioni del carcinoma uroteliale che cercavano di raggruppare i diversi gradi e i particolari disordini citologici di tale patologia; quella più recente è stata proposta nel 1998 dall'Organizzazione Mondiale della Sanità e dalla Società Internazionale di Urologia. (tab. 1).

Secondo tale classificazione le lesioni neoplastiche in situ vengono suddivise in piatte (Tis) e papillari (Ta); e inoltre vengono suddivise in gradi G1, G2, e G3 (grado di differenziazione cellulare) e in tipi o livelli di invasività T0, T1, T2, T3, T4 (11). L'invasione tumorale procede in diverse direzioni: invasione della lamina propria (T1), quindi invasione della muscolare propria (T2), quest'ultima rivestendo un ruolo di primaria importanza per la scelta della terapia e per la prognosi. Quindi la neoplasia procede con l'invasione della sierosa (T3) e degli organi circostanti (T4) (fig. 4).

Nuovi markers coinvolti nel tumore alla

vescica

Consensus International d'esperti di citologia e di markers tumorali della vescica ha valutato quei markers che hanno la capacità di predire la ricorrenza tumorale, la progressione e lo sviluppo di metastasi classificandoli nei seguenti gruppi: 1) markers associati ai microsatelliti, 2) proto-oncogeni/oncogeni, 3) geni soppressori di tumori, 4) regolatori del ciclo cellulare, 5) fattori relativi all'angiogenesi e 6) molecole di adesione della matrice extracellulare (12).

Markers associati ai microsatelliti

Tramite recenti metodologie di genetica molecolare, come l'analisi della perdita di eterozigosità e l'ibridazione in situ fluorescente (FISH), si è visto che nel carcinoma alla vescica è possibile identificare la perdita di diversi geni soppressori di tumori. Per esempio studi sulla scomparsa di eterozigosità hanno dimostrato che la perdita di porzioni cromosomiche come 17p, 3p, 13q, 18q o 10q è presente più frequentemente in carcinomi vescicali di alto grado e stadio (13). Tuttavia ancora non sono stati condotti studi talmente vasti tali da poter attribuire a questo tipo di analisi un valore prognostico.

Proto-oncogeni/oncogeni.

A questa categoria di markers appartengono: 1) il recettore per il fattore di crescita



Figura 4: Diversi livelli di invasività tumorale.

- a) urotelio
- b) lamina propria
- c) porzione superficiale della muscolare propria
- d) porzione profonda della muscolare propria
- e) sierosa
- f) capsula
- g) invasione extra-cellulare.

epidermico (*EGFR*), 2) *HER-2*, 3) *H-Ras*, 4) *bcl-2*, 5) *mdm-2*, 6) *FGFR3* e 7) *c-myc*.

Diversi lavori hanno dimostrato un'associazione positiva tra l'iperespressione di *EGFR* e carcinomi vescicali di alto grado e stadio, ma tramite studi di immunistochemica si è visto che l'espressione di *EGFR* è un fattore prognostico indipendente in pazienti con carcinoma alla vescica avanzato (14,15).

Sono stati svolti diversi studi per valutare il livello d'espressione e il significato prognostico della proteina *HER-2* nel carcinoma uroteliale e si è visto che questo era variabile; infatti in alcuni l'*HER-2* sembra avere un rilevante valore prognostico, in altri no (16).

Inoltre, si è visto che mutazioni a livello dei codoni 12 e 61 del gene *H-ras* sono implicate nello sviluppo e nella progressione in più del 10% di carcinoma alla vescica ma nessuno studio ha mostrato un valore prognostico nella presenza di tali mutazioni (17).

Pollack e collaboratori(18) dimostrarono che l'iperespressione di *bcl-2* era significativamente associata con la progressione della malattia e gli stadi tumorali avanzati durante la radioterapia ma in pasienti trattati con TUR, *bcl-2* non offriva alcuna informazione prognostica utile a predire la ricorrenza o la progressione del tumore (19). Inoltre, nel carcinoma alla vescica si osserva spesso una amplificazione del gene *mdm-2* (20) ma il valore prognostico di questo è ancora dubbio.

Analisi di genetica molecolare hanno mostrato la frequente presenza di mutazioni puntiformi di *FGFR3* nel carcinoma alla vescica, in particolare in quelli di alto grado e stadio (21,22). La presenza di tali mutazioni potrebbe avere un valore prognosti-

co variabile ma ancora non è stato svolto nessuno studio che accerti tale teoria. Inoltre, sono stati svolti dei lavori che dimostravano un'iperespressione di *c-myc* in casi tumorali di alto grado e stadio ma non è stata osservata alcuna correlazione tra questa e la ricorrenza, la progressione e la sopravvivenza del tumore (23,24).

Geni tumore-soppressori

Mutazioni del gene per la *p53* sono tra i più comuni difetti genetici che si ritrovano nei carcinomi umani. Recenti studi svolti su tumori del tratto urinario superiore (25) e sulla vescica (26,27) mostrarono che l'aumento dell'espressione della *p53* è significativamente associata con l'avanzare degli stadi tumorali e con una prognosi insufficiente. Infatti si è mostrata l'espressione della *p53* in PUNLMP (neoplasia uroteliale papillare di basso potenziale maligno) e in NILGC (carcinoma uroteliale papillare non invasivo di basso grado) rispettivamente nel 31 e nel 38% dei casi mentre in NIHGC (carcinoma papillare non invasivo di alto grado) e in pT1 l'espressione della *p53* era evidente rispettivamente nel 75 e nell'84% dei casi (28).

La *p63* è un membro della famiglia della *p53* il cui gene è localizzato sul cromosoma 3q27-28, se ne conoscono due isoforme le quali svolgono funzioni diverse: TAp63 e Δ Np63. Da recenti studi si è visto che la prima isoforma è coinvolta nella stratificazione iniziale dell'epitelio e contribuisce alla proliferazione delle cellule basali, mentre Δ Np63 fa sì che le cellule possano rispondere ai segnali di maturazione. Nella vescica normale TAp63 è espressa nelle cellule dello strato basale mentre Δ Np63 risulta essere assente (29,30); nella vescica con carcinoma si è osservata un'elevata

espressione di $\Delta Np63$ e una diminuzione d'espressione di TAp63. Questi risultati suggerirono che $\Delta Np63$ potrebbe contribuire alla progressione del carcinoma alla vescica e che quindi la p63 potrebbe essere un marker prognostico ma ancora il ruolo chiave della p63 rimane controverso. Per quanto riguarda la possibile correlazione tra la p63 e la p53 si è visto che queste nel carcinoma alla vescica svolgono ruoli diversi e che quindi non esiste alcuna connessione tra le due infatti la p63 non mostra alcuna differenza significativa d'espressione nei diversi gradi tumorali.

Cordon-Cardo e Logothesis con i loro rispettivi collaboratori condussero degli studi sul tumore alla vescica di tipo T2 per valutare il ruolo della proteina Rb (31,32). Da questi si evidenziò che in pazienti con pRb normale il tumore mostrava un indice di sopravvivenza maggiore rispetto a quelli con pRb alterata. Inoltre, Grossman e collaboratori, in uno studio di immunohistochimica su 45 pazienti con tumore alla vescica di tipo T1, verificarono che la perdita dell'espressione della proteina Rb combinata con l'espressione della p53 alterata era associata con una minore sopravvivenza tumorale (33).

Regolatori del ciclo cellulare

A questo gruppo di markers appartengono la proteina p21, la p27, la Ki-67(MIB-1) e le cicline D1 ed E. Il ruolo della p21 come variabile prognostica è dubbio a causa dei pareri discordi ottenuti dai vari studi condotti (34) mentre per la p27 si è trovata una significativa correlazione tra la bassa espressione immunohistochimica della stessa e la ricorrenza in 86 pazienti con carcinoma superficiale (Ta o T1) (35). Quindi, la diminuzione dell'espressione della p27 nel carcinoma alla vescica appare avere un rilevante valore prognostico.

Ki-67 e MIB-1 sono proteine che si accumulano nei nuclei di proliferazione cellulare dalla fase G1 alla mitosi ma non in quelli delle cellule quiescenti o a riposo (36). Un vasto numero di studi definirono la Ki-67 come un promettente marker per la progressione e la ricorrenza del carcinoma alla vescica superficiale mentre rimane dubbio il suo ruolo come marker prognostico in pazienti con tumore localmente avanzato e metastasi. Per quanto riguarda l'espressione di MIB-1 al carcinoma alla vescica non si è osservata nessuna immunoreattività nei casi di vescica normale, men-

TABELLA 2: Classificazione dei più studiati markers tumorali della vescica, con riferimento alle relative note bibliografiche.

Markers associati ai microsatelliti	Proto-oncogeni/ oncogeni	Geni soppressori di tumori	Regolatori del ciclo cellulare	Fattori relativi alla angiogenesi	Molecole di adesione della matrice extracellulare	HSP
17p ¹³	EGFR ^{14,15}	p-53 ²⁵⁻²⁸	p21 ³⁴	VEGF ^{41,42}	MMP-1 ^{45,46}	Hsp27 ^{69,71,73}
3p ¹³	HER-2 ¹⁶	p-63 ^{29,30}	p27 ³⁵	TSP-1 ⁴³	MMP-2 ^{45,46}	Hsp90 ^{70,71,73}
13q ¹³	H-Ras ¹⁷	Rb ³¹⁻³³	Ki-67 (MIB-1) ³⁶⁻³⁸	Ciclo-ossigenasi ²⁴⁴	TIMP-2 ⁴⁵	Hsp60 ^{71,73}
18q ¹³	bcl-2 ^{18,19}		CiclinaD1 ³⁹		Caderina-E ^{47,48}	Hsp70 ⁷¹⁻⁷³
10q ¹³	mdm-2 ²⁰		CiclinaE ⁴⁰		CD44 ⁴⁹	Hsp10 ⁷³
	FGFR3 ^{21,22}				u-Pa ⁵⁰	
	c-myc ^{23,24}				mRRF ⁵¹	

tre questa era presente nel 47% dei casi tumorali. Santos e collaboratori (37) hanno dimostrato che la positività di MIB-1 nel tumore alla vescica porta a un peggiore decorso della malattia e inoltre Yan e collaboratori (38) osservarono che MIB-1 potrebbe essere usato per identificare pazienti con alto rischio di ricorrenza.

La ciclina D1 è un regolatore positivo del ciclo cellulare. Sgambato e collaboratori (39) nei loro studi di immunoistochimica evidenziarono che in pazienti con tumore alla vescica superficiale (Ta o T1) e con una bassa espressione di ciclina D1 il tasso di ricorrenza tumorale è elevato ma non evidenziarono alcuna informazione prognostica sulla progressione della malattia. Inoltre, furono fatti degli studi su campioni di vescica tumorale di stadio variabile da Ta a T3 i quali dimostrarono che una bassa espressione di ciclina E è associata con un basso indice di sopravvivenza del paziente ma non si osservò alcun valore prognostico della stessa, indipendentemente dagli stadi tumorali (40).

Fattori relativi all'angiogenesi

Studi condotti sul *fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF)*, sulla *trombospondina-1* e sulla *cicloossigenasi-2* hanno dimostrato il loro coinvolgimento nel tumore alla vescica anche se rimane ancora incerto il loro ruolo.

Crew e collaboratori (41) hanno osservato che in pazienti con carcinoma alla vescica Ta o T1 la concentrazione del *VEGF* aumentava rispetto ai casi normali dimostrando così una possibile correlazione tra tale fattore e il tasso di ricorrenza tumorale. Tuttavia, tramite uno studio di immunoistochimica svolto su 185 pazienti con tumore alla vescica di tipo Ta o T1 non si osservò alcuna correlazione tra *VEGF* e il tasso di ricorrenza o sopravvivenza del carcinoma (42), quindi il significato prognostico di tale fattore è ancora dubbio.

La *trombospondina-1 (TSP-1)* è una glicoproteina della matrice extracellulare ed è un potente inibitore angiogenetico. Sono state condotte diverse analisi di immunoistochimica per verificare il coinvolgimento di tale fattore nel tumore alla vescica (43) ma tuttavia non si è ancora in grado di trarre delle conclusioni sul significato prognostico della stessa.

Il ruolo che la *cicloossigenasi-2* svolge nel tumore alla vescica è stato esaminato tramite analisi di immunoistochimica. Shirahama e collaboratori (44) osservarono che in

uno studio condotto su 108 pazienti trattati con cistectomia radicale l'espressione della *cicloossigenasi-2* era presente nel 31% dei casi ed era correlata con l'invasione localizzata, linfovaskolare e la ricorrenza, tuttavia la sua espressione non era un marker prognostico indipendente per la sopravvivenza. Molti altri studi sono stati condotti per analizzare il ruolo della *cicloossigenasi-2* nel carcinoma alla vescica ma tuttavia questa è ancora oggetto di ricerca.

Molecole di adesione della matrice extracellulare

Studi condotti sull'espressione delle *metalloproteinasi-2 (MMP-2)* della matrice extracellulare, sui loro *inibitori (TIMP-2)* e sulle *MMP-1* nel tumore alla vescica indicarono che il loro elevato livello d'espressione rispetto alla vescica normale è associato a una diminuzione della sopravvivenza (45). Inoltre, uno studio condotto su 97 pazienti con carcinoma uroteliale indicò che il rapporto nel siero tra *MMP-2* e *TIMP-2* era un significativo e indipendente indicatore di ricorrenza nei pazienti con carcinoma uroteliale avanzato (46), tuttavia rimane ancora sconosciuto come tale rapporto possa provvedere a informazioni distinte sulla progressione del carcinoma.

Un'altra molecola di adesione della matrice extracellulare analizzata è la *caderina-E*. Studi condotti da Bringuier e collaboratori (47) sul tumore alla vescica dimostrarono che la diminuzione dell'espressione della *caderina -E* in tale tumore è generalmente correlata con la progressione dello stesso nella muscolare propria e con metastasi distanti nel caso di tumore di alto grado e stadio. Inoltre, in uno studio condotto su 77 pazienti sottoposti a cistectomia radicale, si è visto, tramite analisi immunoistochimica, che l'espressione della *caderina -E* nel tumore alla vescica è associata con la progressione e la sopravvivenza del tumore e che questa è un predittore indipendente per la progressione della malattia (48).

Altri markers analizzati, appartenenti a tale categoria sono stati il *CD44*(49), le *urokinase-type plasminogen Activator (u-Pa)* (50) e le *multidrug Resistance-Related Proteins (mRRP)* (51) ma ancora il loro ruolo effettivo nel carcinoma alla vescica è oggetto di studio.

Altri markers analizzati nel tumore alla vescica: ruolo delle HSP

Le heat shock proteins (HSP) sono una famiglia di proteine indotte da vari tipi di stress

come il calore, l'alcool e le radiazioni UV. Alcune di queste intervengono come chaperons molecolari per il corretto folding delle proteine cellulari immature sia eucariotiche che procariotiche affinché queste possano essere biologicamente attive, altre intervengono nella degradazione delle proteine non correttamente ripiegate. Recentemente si è andando sempre più delineando il coinvolgimento delle HSP nella patogenesi tumorale. In particolare si è visto che l'HSP70 è maggiormente espressa in tumori della mammella (52), dell'endometrio (53), nell'osteosarcoma (54) e nei tumori renali (55), l'HSP90 è stata principalmente evidenziata in tumori del polmone (56), nelle leucemie (57) e nella patologia tumorale di Hodgkin (58), l'HSP27 è coinvolta nello sviluppo tumorale della ghiandola mammaria (59) e inoltre facilita la crescita, la differenziazione e la motilità di cellule tumorali ovariche. Infine l'HSP60 è stata riscontrata in lesioni pre-maligne della cavità orale (60), nel carcinoma della mammella (61), nel carcinoma ovarico (62), nel carcinoma pancreatico (63) e nella leucemia mieloide (64). Inoltre, una iperespressione delle HSP60 e 10 è stata evidenziata fin dalle tappe precoci della carcinogenesi della esocervice uterina umana (65,66), del colon (67) e della prostata (68). Uno dei primi lavori relativi alla ricerca dell'espressione delle HSP nel tumore vescicale, era teso a ricercare e valutare dal punto di vista diagnostico e prognostico, l'espressione dell'HSP27. Questo lavoro ha escluso ogni possibile relazione tra la stessa e il grado di differenziazione cellulare, gli stadi T, il coinvolgimento linfonodale, la ricorrenza locale, la metastasi e la sopravvivenza cellulare; quindi si arrivò alla conclusione che l'espressione dell'HSP27 non aveva un significato rilevante né da un punto di vista diagnostico né prognostico nel carcinoma alla vescica (69).

Studi più recenti hanno valutato l'espressione dell'HSP90 in campioni con carcinoma vescicale superficiale ed invasivo evidenziando una maggiore espressione di questa proteina nei secondi (70). Questo risultato è stato confermato da Lebret e i suoi collaboratori (71), i quali si occuparono di valutare la correlazione tra le HSPs 60, 90, 27, 70, il grado G e lo stadio T. Da ciò si osservò una correlazione tra l'HSP60 e 90 ed il carcinoma superficiale (T0), mentre nessuna correlazione era presente tra HSP27 e 60 con gli stadi T avanzati. Syrigos evidenziò una iperespressione dell'HSP70 in relazione al grado G (72).

Infine, uno studio più recente (73) si occupò di valutare, tramite indagine immunohistochimica, l'espressione e la presenza dell'HSP60, dell'HSP10, dell'HSP90, dell'HSP70 e dell'HSP27 su campioni di vescica provenienti da pazienti normali e con TCC con differente grado di differenziazione cellulare e di invasione tumorale al fine di verificare il valore di queste molecole come markers biologici, nel carcinoma a cellule transizionali della vescica. Alcuni risultati ottenuti furono in accordo con dati riportati nei precedenti lavori altri in contrasto e precisamente: in accordo con i risultati di Syrigos, il numero di casi positivi all'HSP70 aumentava nei TCC con G=3; In accordo con i dati di Lebret, il numero di casi positivi all'HSP60 si riduceva nei TCC con T>1; In accordo con i dati di Storm, non si ritrovò alcuna correlazione tra l'espressione dell'HSP27 e il crescere del grado di differenziazione tumorale; In contrasto con i dati di Storm, si ritrovò una correlazione tra la percentuale di cellule tumorali positive all'HSP27 e la crescita del grado G. Inoltre, in questo studio venne evidenziato che: l'HSP10 aumentava significativamente nei casi di TCC rispetto ai casi di vescica normale; l'HSP10 e l'HSP90 aumentavano significativamente nei casi di TCC con G≥2, rispetto ai casi di vescica normale; l'HSP70 aumentava significativamente nei casi di TCC T>1, rispetto ai casi di vescica normale; la percentuale di cellule positive alle HSP10-90/70 aumentava significativamente nei casi di TCC con G≥2, rispetto ai casi di vescica normale. Da ciò si ipotizzò che l'aumento dell'espressione delle HSP90-70/10/27 al crescere del grado G sia correlata alla aumentata velocità di crescita tumorale.

Conclusioni

Nonostante i vari studi condotti sui markers biologici del carcinoma alla vescica ancora non siamo in grado di dare delle risposte certe sul ruolo predittivo che molti di questi svolgono nel carcinoma alla vescica, a causa dei pareri contrastanti ottenuti. Tuttavia, i recenti progressi delle conoscenze nel campo della diagnostica molecolare lasciano ben sperare che un futuro in cui queste tecniche possano permettere una diagnosi più precoce e una terapia più mirata sia non lontano.

Bibliografia:

1. Parkin DM, Whelan SL, Felay J, et al: Cancer Incidence in Five Continents, Volume VIII (No. 155). Lyon,

- France, IARC Publications, 2002.
2. Reid LM, Leav I, Kwan PW, et al: Characterization of a human, sex steroid-responsive transitional cell carcinoma maintained as a tumor line (R198) in athymic nude mice. *Cancer Res* 44: 4560-4573, 1984.
 3. Cantor KP, Lynch CF, and Johnson D: Bladder cancer, parity, and age at first birth. *Cancer Causes Control* 3: 57-62, 1992.
 4. Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, et al (Eds): SEER: Cancer Statistics Review, 1975-2002. Bethesda, MD, National Cancer Institute, 2004. Available at: <http://www.seer.cancer.gov/csr/1975-2002>. Accessed December 12, 2005.
 5. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, et al: Bladder Cancer: Epidemiology, staging and grading, and diagnosis. 2005.
 6. Kaldor JM, Day NE, Kittelmann B, et al: Bladder tumors following chemotherapy and radiotherapy for ovarian cancer: a case-control study. *Int J Cancer* 63: 1-6, 1995.
 7. Hartge P, Hoover R, West DW, et al: Coffee drinking and risk of bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 70: 102-1-1026, 1983.
 8. Sala M, Cordier S, Chang-Claude J, et al: Coffee consumption and bladder cancer in nonsmokers: a pooled analysis of case-control studies in European countries. *Cancer Causes Control* 11: 925-931, 2000.
 9. Gago-Dominguez M, Castela JE, Yuan JM, et al: Use of permanent hair dyes and bladder-cancer risk. *Int J Cancer* 91: 575-579, 2001.
 10. Kiemeny LA, and Schoenberg M: Familial transitional cell carcinoma. *J Urol* 156: 867-872, 1996.
 11. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, et al, for the Bladder Consensus Conference Committee: The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. *Am J Surg Pathol* 22: 1435-1448, 1998.
 12. Habuchi T, Marberger M, Droller MJ, et al: Prognostic markers for bladder cancer: international Consensus Panel on bladder tumor markers: 2005.
 13. Knowles MA: What we could do now: molecular pathology of bladder cancer. *Mol Pathol* 54: 215-221, 2001.
 14. Neal DE, Marsh C, Bennett MK, et al: Epidermal-growth-factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumors. *Lancet* 1:366-368, 1985.
 15. Lipponen P, and Eskelinen M: Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long-term prognosis. *Br J Cancer* 69: 1120-1125, 1994.
 16. Gandaur-Edwards R, Lara PN Jr, Folkins AK, et al: Does HER2/neu expression provide prognostic information in patients with advanced urothelial carcinoma? *Cancer* 95: 1009-1015, 2002.
 17. Knowles MA, and Williamson M: Mutation of H-ras is infrequent in bladder cancer: confirmation by single-strand conformation polymorphism analysis, designed restriction fragment length polymorphisms, and direct sequencing. *Cancer Res* 53: 133-139, 1993.
 18. Pollack A, Wu CS, Czerniak B, et al: Abnormal bcl-2 and p-RB expression are independent correlates of radiation response in muscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res* 3: 1823-1829, 1997.
 19. Stavropoulos NE, Filiadis I, Ioachim E, et al: Prognostic significance of p53, bcl-2 and Ki-67 in high risk superficial bladder cancer. *Anticancer Res* 22: 3759-3764, 2002.
 20. Habuchi T, Kinoshita H, Yamada H, et al: Oncogene amplification in urothelial cancers with p53 gene mutation or MDM2 amplification. *J Natl Cancer Inst* 86: 1331-1335, 1994.
 21. Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, et al: Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas, *Nat Genet* 23: 18-20, 1999.
 22. van Rhijn BW, Lurkin I, Radvanyi F, et al: The fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation is a strong indicator of superficial bladder cancer with low recurrence rate. *Cancer Res* 61: 1265-1268, 2001.
 23. Kotake T, Saiki S, Kinouchi T, et al: Detection of the c-myc gene product in urinary bladder cancer. *Jpn J Cancer Res* 81: 1198-1201, 1990.
 24. Schmitz-Drager BJ, Schulz WA, Jurgens B, et al: c-myc in bladder cancer: clinical findings and analysis of mechanism. *Urol Res* 25 (suppl 1): S45-S49, 1997.
 25. Zigeuner R, Tsybrovskyy O, Ratscheck M, Rehak P, Lipsky K, Langner C: Prognostic impact of p63 and p53 expression in upper urinary tract transitional cell carcinomas. *Urology* 63: 1079-1083, 2004.
 26. Lu ML, Wikman F, Orntoft T, Charytonowicz E, Rabbani F, Zhang Z, Dalbagni G, Pohar KS, Yu G, Cordon-Cardo C: Impact of alterations affecting the p53 pathway in bladder cancer on clinical outcome assessed by conventional and array-based methods. *Clin Cancer Res* 8: 171-179, 2002.
 27. San Miguel Fraile P, Anton Badiola I, Ortiz Rey JA, Alvarez Alvarez C, Fernandez Costas A, Lago Fernandez M, Pelaez Boismorand E, Zungri Telo E, De La Fuente Buceta A: Comparative study of the expression of p53, Ki-67, bcl-2 and CK20 in superficial transitional carcinoma of the bladder: correlation with recurrence, histological grade, and clinical stage. *Actas Urol Esp* 2-7:587-593, 2003.
 28. Eva Comperat, Philippe Camparo, Rachel Haus, Emmanuel Chartier-Kastler, Stephane Bart, Annick Delcourt, Alain Houlgatte, Richard Francois, Frederique Capron, Annick Viellefond: Immunohistochemical expression of p63, p53 and MIB-1 in urinary bladder carcinoma. A tissue microarray study of 158 cases: 2005.
 29. DiComo CJ, Urist MJ, Babayan I, Drobnjak M, Hedvat CV, Teruya-Feldstein J, Pohar K, Hoos A, Cordon-Cardo C p63 expression profiles in human normal and tumor tissue. *Clin Cancer Res* 8: 494-501, 2002.
 30. Park BJ, Lee SJ, Lee KSJ, Lee CH, Chang SG, Park JH et al: Frequent alteration of p63 expression in human primary bladder carcinomas. *Cancer Res* 60: 337-0-3374, 2000.
 31. Cordon-Cardo C, Wartinger D, Petrylak D, et al: Altered expression of the retinoblastoma gene product prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 84: 1251-1256, 1992.
 32. Logothetis CJ, Xu HJ, Ro JY, et al: Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 84:1256-1261, 1992.
 33. Grossman HB, Liebert M, Antelo M, et al: p53 and Rb expression predict progression in T1 bladder cancer. *Clin Cancer Res* 4: 829-834, 1998.
 34. Liukkonen T, Lipponen P, Raitanen M, et al, for the Finbladder Group: Evaluation of p21 WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression in the progression of superficial bladder cancer. *Urol Res* 28: 285-292, 2000.
 35. Kamai T, Takagi K, Asami H, et al: Decreasing of p27 (Kip1) and cyclin E protein levels is associated with progression from superficial into invasive bladder cancer. *Br J Cancer* 84: 1242-1251, 2001.
 36. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, et al: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133: 1710-1715, 1984.
 37. Santos L, Amaro T, Costa C, et al: Ki-67 index enhances the prognostic accuracy of the urothelial superficial bladder carcinoma risk group classification. *Int J Cancer* 105: 267-272, 2003.
 38. Yan Y, Andriole GL, Humphrey PA, Kibel AS: Pat-

- terns of multiple recurrences of superficial (Ta/T1) transitional cell carcinoma of bladder and effects of clinicopathologic and biochemical factors. *Cancer* 95: 1239-1246, 2002.
39. Sgambato A, Migaldi M, Faraglia B, et al: Cyclin D1 expression in papillary superficial bladder cancer: its association with other cell cycle associated proteins, cell proliferation and clinical outcome. *Int J Cancer* 97: 671-678, 2002.
40. Richter J, Wagner U, Kononen J, et al: High-through-put tissue microarray analysis of cyclin E gene amplification and overexpression in urinary bladder cancer. *Am J Pathol* 157: 787-794, 2000.
41. Crew JP, O'Brien T, Bicknell R, et al: Urinary vascular endothelial growth factor and its correlation with bladder cancer recurrence rates. *J Urol* 161: 799-804, 1999.
42. Chow NH, Liu HS, Chan SH, et al: Expression of vascular endothelial growth factor in primary superficial bladder cancer. *Anticancer Res* 19: 4593-4597, 1999.
43. Grossfeld GD, Ginsberg DA, Stein JP, et al: Thrombospondin-1 expression in bladder cancer association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 89: 219-227, 1997.
44. Shirahama T, Arima J, Akiba S, et al: Relation between cyclooxygenase-2 expression and tumor invasiveness and patient survival in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer* 92: 188-193, 2001.
45. Kanayama H, Yokota K, Kurakawa Y, et al: Prognostic values of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in bladder cancer. *Cancer* 82: 1359-1366, 1998.
46. Gohji K, Fujimoto N, Ohkawa J, et al: Imbalance between serum matrix metalloproteinase-2 and its inhibitor as a predictor of recurrence of urothelial cancer. *Br J Cancer* 77: 650-655, 1998.
47. Binguier PP, Umbas R, Schafasma HE, et al: Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumor. *Cancer Res* 53: 3241-3245, 1993.
48. Byrne RR, Shariat SF, Brown R, et al: E-cadherin immunostaining of bladder transitional cell carcinoma, carcinoma in situ and lymph node metastases with long-term followup. *J Urol* 165:1473-1479, 2001.
49. Matsumura Y, Sugiyama M, Matsumura S, et al: Unusual retention of introns in CD44 gene transcripts in bladder cancer provides new diagnostic and clinical oncological opportunities. *J Pathol* 177:11-20, 1995.
50. Hasui Y, Marutsuka K, Asada Y, et al: Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in patients with superficial bladder cancer. *Urology* 47: 34-37, 1996.
51. Natio S, Sakamoto N, Kotoh S, et al: Correlation between the expression of P-glycoprotein and multidrug-resistant phenotype in transitional cell carcinoma of the urinary tract. *Eur Urol* 22: 158-162, 1992.
52. Jameel A, Skilton RA, Campbell TA, Chander SK, Coombes R, Luqmani YA: Clinical and biological significance of HSP89 alpha in human breast cancer. *Int. J. Cancer*. 50: 409-415, 1992.
53. Nanbu K, Konishi I, Mandai M, Kuroda H, Hamid AA, Komatsu T, Mori T: Prognostic significance of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in endometrial carcinomas. *Cancer detect. Prev.*22: 549-555, 1998.
54. Trieb K, Lechleinter T, Lang S, Windhager R, Kotz R and Dirnhofer S: Heat shock protein 72 expression in osteosarcomas correlates with good response to neoadjuvant chemotherapy. *Hum. Pathol.* 29: 1050-1055, 1998.
55. Santarosa M, Favaro D, Quaià M, Galligioni E: Expression of Heat shock protein 72 in renal cell carcinoma: possible role and prognostic implications in cancer patients. *Eur. J. Cancer* 33: 873-877, 1997.
56. Wong HR, Wispe JR: The stress response and lung. *Am J. Physiol* 273: L1-L9, 1997.
57. Yufu Y, Nishimura J, Nawata H: High constitutive expression of heat shock protein 90 alpha in human acute leukemia cells. *Leuk. Res* 16: 597-605, 1992.
58. Hsu PL, Hsu SM: Abundance of heat shock proteins in malignant cells of Hodgkin's disease. *Cancer Res* 58: 5507-5513, 1998.
59. Piotrowicz R: Hsp27 regulation of breast tumor blood vessel growth. *1 fb-0367*, 1995.
60. Castelli M, Cianfriglia F, Manieri A, Palma L, Pezzato RW, Falasco G, and Delpino: anti-p53 and anti-heat shock proteins in patients with malignant or preneoplastic lesions of the oral cavity. *Anticancer Res.* 21:753-758, 2001.
61. Yano M, Naito Z, Yokoyama M, Shiraki Y, Ishiwata T, Inokuki M, Asano G: Expression of HSP90 and cyclin D1 in human breast cancer. *Cancer Lett.* 137: 45-51, 1999.
62. Yamamoto K, Okamoto A, Isonishi S, Ochiai K, Ohtake Y: Heat shock protein 27 was up-regulated in cisplatin resistant human ovarian tumor cell line and associated with the cisplatin resistance. *Cancer Lett.* 168: 173-181, 2001.
63. Vendetti S, Cicconi R, Piselli P, Vismara D, Cassol M and Delpino A: Induction and membrane expression of heat shock proteins in heat treated HPC-4 cells in correlated with increased resistance to Lak-mediated lysis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 19:329-334, 2000.
64. Lu X and Seligy VLL: HSP60/Chaperonin gene expression and differentiation of human colon adenocarcinoma and multipotent leukemic cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 186: 371-377, 1992.
65. Cappello F, Bellafiore M, Palma A, Marcianò V, Martorana G, Belfiore P, Martorana A, Farina F, Zummo G, Bucchieri F: 60Kda Heat Shock Protein (HSP60) expression increases during carcinogenesis of uterine exocervix. *Pathobiology* 70: 83-88, 2002.
66. Cappello F, Bellafiore M, David S, Anzalone R and Zummo G: Ten-kilodalton Heat shock protein is overexpressed during carcinogenesis of large bowel and uterine exocervix. *Cancer Lett.* 196(1): 35-41, 2003.
67. Cappello F, Bellafiore M, Palma A, David S, Marcianò V, Bartolotta T, Modica G, Farina F, Zummo G, Bucchieri F: 60KDa chaperonin (HSP60) is over-expressed during colorectal carcinogenesis. *Eur J Histochem.* 47 (2): 105-10, 2003.
68. Cappello F, Rappa F, David S, Anzalone R and Zummo G: Immunohistochemical evaluation of PCNA, p53, HSP60, HSP10, and MUC-2 presence and expression in prostate carcinogenesis. *Anticancer Res.* 23(2B): 1325-31, 2003.
69. Storm FK, Mahvi DM, Gilchrist KV: Hsp27 has no diagnostic or prognostic significance in prostate or bladder cancers. *Urology*, 42: 379, 1993.
70. Cardillo MR, Sale P, Di Silverio F: Heat shock protein-90, IL-6 and IL10 in bladder cancer. *Anticancer Res.* 20: 4579, 2000.
71. Lebre T, Watson R.W, Molin V, O'Neill A, Gabriel C, Fitzpatrick J.M, and Botto H: Heat Shock proteins HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90: expression in bladder carcinoma. *Cancer*, 98: 970, 2003.
72. Syrigos KN, Harrington KJ, Karayiannakis AJ, Sekara E, Chatziyianni E, Syrigou EI, and Waxman J: Clinical significance of heat shock protein-70 expression in bladder cancer. *Urology*, 61: 677, 2003.
73. Cappello F, David S, Ardizzone N, Rappa F, Marasà L, Bucchieri F, Zummo G: Expression of Heat Shock Proteins Hsp10, Hsp27, Hsp60, Hsp70 and Hsp90 in Urothelial Carcinoma of Urinary Bladder. *J Cancer Molec.* 2:73-77, 2006.