

# HOT TOPICS IN UROLOGIA



## Un nuovo Test di Chemiosensibilità alla terapia endovesicale in pazienti con neoplasia vescicole non muscolo invasiva: verso una terapia personalizzata

Paola Gazzaniga#, Angela Gradilone#, Ettore de Berardinis\*, Arianna Petracca#, Chiara Nicolazzo#, Gian Maria Busetto\*, Alessandro Sciarra\*, Stefano Salsiccia\*, Franco di Silverio\*, Anna Maria Aglianò#

# Dipartimento di Medicina Sperimentale, “Sapienza” Università di Roma

\*Dipartimento di Urologia, “Sapienza” Università di Roma

Publicato su BJU Int, 2009, in press.

### **Riassunto:**

**Obiettivo:** Quale sia la scelta terapeutica ottimale dopo TURB nelle neoplasie vescicali non muscolo invasive ancora rappresenta una problematica aperta e molto sentita. Considerato l'elevato tasso di recidive osservato in tale patologia, si rende necessaria l'individuazione di marcatori molecolari che possano predire la risposta alla terapia nel singolo paziente, evitando in tal modo regimi tossici e spesso inutili. Scopo di tale studio è stato quello di definire un pannello di marcatori di risposta individuale alla terapia endovesicale standard e di correlarlo con l'insorgenza di recidive precoci in un follow up di 12 mesi.

**Metodi:** a) Tale studio prospettico è stato condotto su 37 pazienti affetti da carcinoma della vescica non muscolo invasivo, attraverso l'analisi molecolare dell'espressione di geni specificamente correlati alla resistenza ai regimi endovesicali standard. Tale profilo di chemiosensibilità è stato poi correlato all'insorgenza di recidive precoci in un follow up di 12 mesi.

b) prestazioni fornite dal reparto di appartenenza: TURB, analisi oncocitologica, instillazioni di chemioterapici endovesicali, immunoprofilassi endovesicale, cistoscopia e mapping vescicale.

c) Criteri di inclusione: pazienti con neoplasia vescicale primitiva non muscolo invasiva candidati a TURB e successiva terapia endovesicale. Dal disegno dello studio ad oggi, 37 pazienti hanno completato il follow up (12 mesi).

d) Trattamento eseguito: TURB seguita da instillazioni endovesicali, in accordo con quanto previsto dalle linee guida EAU 2008 per la malattia non muscolo invasiva.

e) Su un frammento tumorale, previo consenso informato dei pazienti, è stata effettuata l'analisi in RT-PCR dei seguenti geni: MRP1 e MRP2, come marcatori di risposta a mitomicina c, epirubicina e doxorubicina; hENT e dck, come marcatori di risposta alla gemcitabina;  $\alpha\beta 1$  integrina, come marcatore di risposta presunto al BCG. Inoltre, è stato analizzato su ogni campione un profilo di “elevato rischio molecolare” in base alla sovraespressione di bcl-2 e survivina, geni a funzione antiapoptotica.

**Risultati:** Il profilo molecolare ad elevato rischio, valutato in base alla sovraespressione di geni a funzione antiapoptotica, correla con l'insorgenza di recidive precoci nell'86% dei pazienti.

Il profilo molecolare di chemioresistenza correla con la risposta al trattamento nel 96% dei pazienti.

**Conclusioni:** Questo test rappresenta il primo approccio ad una terapia personalizzata nel trattamento endovesicale dei pazienti con neoplasia vescicale non muscolo invasiva. Se tali risultati saranno confermati su più ampio numero di casi, tale test potrebbe rappresentare un valido ausilio all'urologo nella scelta terapeutica ottimale, che sia rigorosamente individualizzata, in modo da evitare terapie non utili e spesso gravate da pesanti effetti collaterali.

## 1. Introduzione

Nonostante le neoplasie della vescica vengano diagnosticate come forme non muscolo invasive nel 75% dei casi, il tasso di recidiva dopo trattamento chirurgico oscilla tra il 55% e il 75%, e nel 25% dei casi si assiste a progressione di malattia verso una forma muscolo invasiva. Tali progressioni sono tuttora difficili da prevedere utilizzando i criteri clinici standard che definiscono l'“alto rischio”, quali il grado, il numero di lesioni, la dimensione della lesione, lo stadio e la presenza di CIS concomitante; al momento attuale, mancano marcatori molecolari che siano in grado di identificare i pazienti ad elevato rischio di recidiva. Un'ulteriore problematica aperta è rappresentata dall'efficacia dei regimi chemioterapici endovesicali standard, i quali, nonostante siano in grado di ridurre del 14% i tassi di recidiva, poco o nulla influiscono sulla progressione di malattia e sulla sopravvivenza.

Da questi dati è chiaro che gli obiettivi da perseguire allo scopo di migliorare la prognosi di tali pazienti sono l'identificazione precoce della forme ad alto rischio di recidiva e l'ottimizzazione delle opzioni terapeutiche.

Il fenomeno della farmacoresistenza insorge frequentemente durante la progressione neoplastica, e ha come conseguenza la proliferazione di cloni cellulari con peculiari caratteristiche di aggressività e incapaci di morire per apoptosi sotto l'effetto dei chemioterapici.

L'insorgenza di polichemiesistenza si sviluppa frequentemente in corso di chemioterapia, e rappresenta una causa fondamentale di fallimento terapeutico nella maggior parte dei tumori solidi trattati con alcaloidi della vinca, antracicline, agenti alchilanti, derivati del platino e analoghi nucleosidici. Tale fenomeno è mediato dalla sovraespressione di sistemi di trasporto (glicoproteina p, mpr), proteine transmembrana appartenenti alla superfamiglia dei trasportatori “ATP-binding cassette”. Molti agenti chemioterapici convenzionali (antracicline, camptotecine, tassani, alcaloidi della vinca, intercalanti sintetici) sono potenziali substrati per questi trasportatori, che funzionano quali pompe di efflusso mirate a rimuovere dalla cellula tossine esogene o metaboliti tossici. I trasportatori sono anche implicati in meccanismi di sequestro subcellulare del farmaco. È importante sottolineare che questi trasportatori hanno un rilevante ruolo fisiologico (barriera emato-encefalica, assorbimento intestinale, ecc.) e pertanto condizionano il comportamento farmacologico *in vivo*. In alcuni tumori solidi, come nel carcinoma

polmonare non microcitoma, è stato descritto il fenomeno della “resistenza indotta da chemioterapia”(CIR), che consiste nella selezione, da parte del chemioterapico stesso (ifosfamide e vincristina nel NSCLC), di cloni che, eludendo la morte per apoptosi e proliferando in presenza del farmaco, sono responsabili del ben noto fenomeno della progressione sotto trattamento. Se tali trasportatori svolgano un ruolo nella chemioresistenza delle neoplasie vescicali non muscolo invasive è, al momento attuale, non chiaro (1).

Dal momento che la scelta terapeutica ottimale dopo TUR ancora rappresenta una problematica aperta, si rende necessaria l'individuazione di marcatori molecolari che possano predire la risposta alla terapia nel singolo paziente, evitando in tal modo regimi tossici e spesso inutili.

Scopo di tale studio è stato quello di caratterizzare le neoplasie vescicali non muscolo invasive da un punto di vista molecolare allo scopo di identificare i pazienti ad elevato rischio di recidiva, e di tracciare per il singolo paziente un profilo molecolare di chemiosensibilità verso i farmaci comunemente utilizzati in regime endovesicale. Il pannello di geni da analizzare comprende MRP1 e MRP2 (multidrug resistente related proteins 1 e 2), trasportatori di mitomicina, epirubicina e doxorubicina, e i geni hENT-1 (human equilibrative nucleoside transporter 1) e dCK (deossicitidinchinasi), implicati nel trasporto e metabolizzazione della gemcitabina. Considerato l'uso esteso del BCG nella immunoprofilassi delle recidive, una parte importante dello studio è stata dedicata allo studio di eventuali marcatori di resistenza al BCG. Gli studi sul meccanismo di azione del BCG sull'epitelio transizionale suggeriscono che i due recettori per la fibronectina, le integrine alfa5 e beta1, condizionano il legame del BCG alle cellule tumorali e la sua internalizzazione.

Inoltre, considerato il ruolo di bcl-2 e survivina, geni ad azione antiapoptotica, nella progressione del carcinoma vescicale (2-3-4), su ogni campione è stato analizzato il profilo di tali geni che, se sovraespressi, definiscono un profilo da noi definito “ad elevato rischio molecolare”.

Una volta ottenuti entrambi i profili –il primo di “rischio molecolare” e il secondo di chemiosensibilità individuale - questi sono stati correlati alla comparsa di recidive precoci e alla risposta alla terapia endovesicale in un follow up di 12 mesi.

## 2. Materiali e metodi

Al momento attuale, sono stati inclusi nello studio 35 pazienti con neoplasia vescicale non muscolo invasiva, candidati alla TURB seguita da trattamento endovesicale. Dopo TURB, i pazienti sono stati sottoposti a terapia endovesicale, secondo il profilo di rischio individuale, e seguendo le linee guida EAU 2008 per la malattia non muscolo invasiva.

I pazienti sono stati seguiti successivamente tramite cistoscopia ogni 3 mesi. Tra i pazienti inclusi nello studio, 17 (ad alto rischio) sono stati sottoposti ad immunoterapia con BCG, e 18 (a rischio intermedio/basso) con chemioterapia topica endovesicale (3 con mitomicina e 15 con gemcitabina). Abbiamo considerato non responsivi alla terapia i pazienti con le seguenti caratteristiche: comparsa di malattia muscolo invasiva, comparsa di recidiva, comparsa di CIS o incremento dei parametri T e G durante il follow-up.

Dopo TURB, un frammento di tessuto tumorale è stato, dopo consenso informato, conservato a -80°C per le indagini molecolari. Da ogni campione è stato estratto l'RNA totale, sottoposto poi ad analisi in RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction).

Per ogni paziente è stato pertanto valutato un primo profilo molecolare di resistenza all'apoptosi attraverso l'analisi di bcl-2 e survivina; tale profilo è stato da noi identificato come "profilo ad elevato rischio molecolare", come già precedentemente descritto (2-3-4).

E' stato poi tracciato un secondo profilo specifico

di chemioresistenza nei confronti dei farmaci tradizionalmente usati, attraverso l'analisi dell'espressione di MRP2 (resistenza a mitomicina, epi-doxorubicina); hENT e dck (resistenza alla gemcitabina);  $\alpha 5\beta 1$  integrina (resistenza al BCG). Una quantificazione dei prodotti di amplificazione è stata ottenuta tramite analisi densitometrica delle bande e normalizzazione con il GAPDH utilizzato come controllo interno. Tale approccio è stato recentemente validato su pazienti oncologici con malattia metastatica (5).

In base ai livelli di espressione dei singoli geni, è stato stabilito, per ogni paziente, un profilo molecolare di sensibilità ai singoli regimi endovesicali, secondo il seguente schema:

sensibilità: rapporto MRP /GAPDH <1

sensibilità intermedia: MRP /GAPDH =1

resistenza: MRP /GAPDH >1

La sensibilità alla gemcitabina è stata valutata come segue:

sensibilità: rapporto hENT-dck/GAPDH >1

sensibilità intermedia: rapporto hENT-dck/GAPDH =1

resistenza: rapporto hENT-dck/GAPDH <1

La sensibilità al BCG è stata valutata come segue:

sensibilità: rapporto  $\alpha 5\beta 1$  integrina /GAPDH >1

sensibilità intermedia: rapporto  $\alpha 5\beta 1$  integrina /GAPDH =1

resistenza: rapporto  $\alpha 5\beta 1$  integrina /GAPDH <1

Nello stesso modo è stato valutato il profilo generico di resistenza all'apoptosi, attraverso la valutazione dell'espressione di bcl-2 e survivina. I pazienti i cui tumori mostravano elevati livelli di bcl-2, survivina o entrambi sono stati classificati come "ad elevato rischio molecolare".

Allo scopo di stabilire se tali profili molecolari

gene analizzato	MRP2	$\alpha 5\beta 1$	hENT+ dck +
farmaco	mit. C, epirub, doxorub	BCG	gemcitabina
chemiosensibilità individuale	resistente	sensibile	resistente
trattamento endovesicale previsto	BCG		
previsione da profile molecolare	sensibile		

Tab. 1. Scheda di chemiosensibilità (paz. 25)

abbiano o meno valore predittivo, i risultati ottenuti mediante caratterizzazione molecolare delle neoplasie sono stati correlati, al momento della rivalutazione del paziente, con la risposta clinica nei primi 12 mesi di follow up.

### 3. Risultati

Sulla base del profilo generico di resistenza all'apoptosi, abbiamo evidenziato 11 pazienti con profilo molecolare "ad alto rischio" e 24 "a basso rischio."

In base all'espressione dei geni correlati alla resistenza ai singoli regimi terapeutici, sono stati individuati 11 pazienti chemioresistenti e 24

sensibili. In Fig. 1 sono mostrati i risultati dell'analisi molecolare ottenuti su 3 pazienti, mentre in Tab. 1 è mostrato un test di chemiosensibilità effettuato su un paziente, a titolo esemplificativo.

La correlazione con i dati di follow up a 12 mesi ha evidenziato che il profilo predittivo di "elevato rischio molecolare" correla con il tempo libero da malattia nell'86% dei casi, mentre il profilo specifico di chemiosensibilità correla con la risposta clinica al regime endovesicale effettuato nel 97% dei casi (Tabella 2).

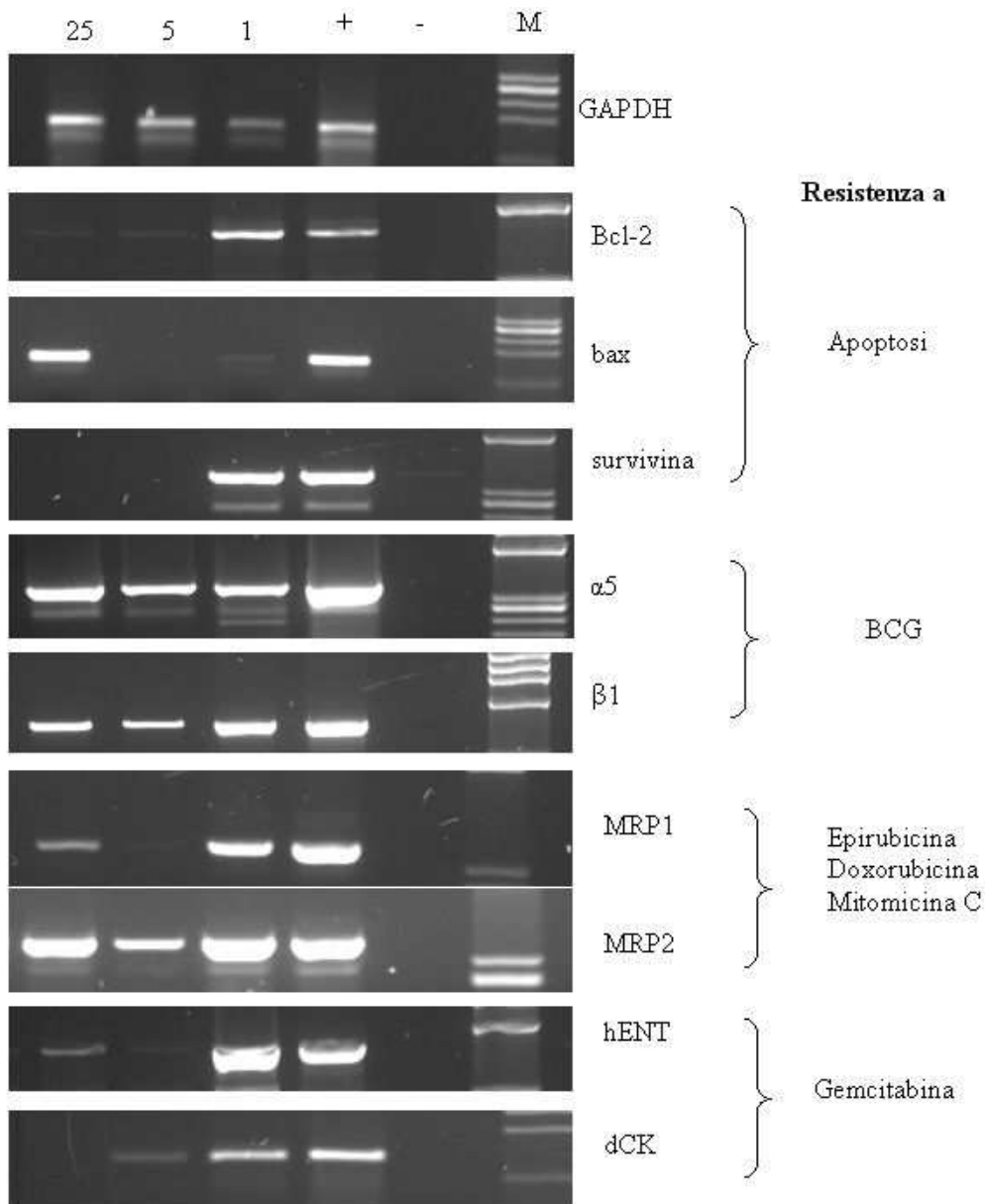


Fig. 1 Analisi molecolare effettuata su 3 pazienti. Dopo reazione di RT-PCR una aliquota di ogni amplificato è stata sottoposta ad elettroforesi su gel di agaroso 2% ed etidio bromuro e visualizzata tramite ultravioletto.

#### 4. Discussione

Al momento attuale non esistono marcatori predittivi di risposta alla terapia endovesicale nelle neoplasie vescicali non muscolo invasive, nelle quali, considerato l'elevato tasso di recidive, si impone l'adozione di un trattamento personalizzato. Questo studio traslazionale preliminare, sebbene effettuato su un numero esiguo di pazienti, ci ha permesso per la prima volta di tracciare per ogni paziente un profilo molecolare di "elevato rischio" e un profilo di chemiosensibilità ai singoli regimi standard effettuati in regime endovesicale. Tali profili correlano con la risposta clinica rispettivamente

nell'86% e nel 97% dei pazienti, e sono entrambi in grado di identificare i pazienti a rischio di recidive precoci, e quelli destinati a non rispondere al trattamento.

Tale saggio è poco costoso, di facile e rapida esecuzione, e quindi candidato ad un futuro impiego clinico.

I nostri risultati, che stiamo al momento confermando su una più ampia coorte di pazienti, potrebbero rappresentare il primo passo verso un approccio terapeutico personalizzato, che possa essere di ausilio all'urologo nell'ardua scelta del "regime terapeutico ottimale", evitando l'uso di farmaci non idonei e spesso gravati da pesanti effetti collaterali.

Tab.2 Previsione molecolare di chemiosensibilità e correlazione con dati di follow up

paz	stadio/grado	regime adottato.	risultati test chemiosensibilità			previsione al regime adottato	follow up (12 mesi)
			epirubicina doxorubicina mitomicina. C	gemcit	BCG		
1	TaG1	mit.c	res	sens	sens	resistente	recidiva
2	TaG1	BCG	res	sens	res	resistente	recidiva
3	TaG3	BCG	sens	sens	sens	sensibile	libero da malattia
4	TaG2	BCG	sens	sens	sens	sensibile	libero da malattia
5	TaG2	gem	interm	res	sens	resistente	recidiva
6	TaG1	gem	res	sens	interm	sensibile	libero da malattia
7	TaG3	gem	res	sens	sens	sensibile	libero da malattia
8	T1G1	gem	res	sens	res	sensibile	libero da malattia
9	TaG3	mit.c	sens	sens	sens	sensibile	libero da malattia
10	TaG2	BCG	res	sens	sens	sensibile	libero da malattia
11	TaG1	gem	res	sens	interm	sensibile	libero da malattia
12	TaG2	gem	interm	sens	sens	sensibile	libero da malattia
13	TaG1	gem	res	sens	sens	sensibile	libero da malattia
14	T1G3	BCG	res	sens	res	resistente	recidiva
15	T1G1	BCG	interm	res	sens	sensibile	libero da malattia
16	TaG2	gem	res	res	sens	resistente	recidiva
17	T1G1	BCG	res	interm	res	resistente	recidiva
18	T1G1	gem	res	sens	sens	sensibile	libero da malattia
19	T1G1	gem	sens	sens	res	sensibile	libero da malattia
20	TaG2	mit.c	sens	sens	res	sensibile	libero da malattia
21	T1G3	BCG	res	sens	res	resistente	recidiva
22	T1G3	BCG	sens	sens	sens	sensibile	libero da malattia
23	TaG2	gem	interm	res	sens	resistente	recidiva

24	T1G1	gem	sens	res	sens	resistente	libero da malattia
25	T1G3	BCG	res	res	sens	sensibile	libero da malattia
26	T1G3	BCG	sens	res	sens	sensibile	libero da malattia
27	T1G3	BCG	sens	res	sens	sensibile	libero da malattia
28	TaG2	BCG	res	sens	res	resistente	recidiva
29	TaG2	BCG	res	sens	sens	sensibile	libero da malattia
30	T1G1	gem	sens	sens	res	sensibile	libero da malattia
31	TaG2	gem	sens	sens	res	sensibile	libero da malattia
32	TaG2	BCG	sens	sens	res	sensibile	libero da malattia
33	TaG2	BCG	res	sens	sens	sensibile	libero da malattia
34	TaG2	gem	res	res	sens	resistente	progressione
35	T1G3	BCG	sens	res	sens	sensibile	libero da malattia

## Bibliografia

- [1] 1 Paola Gazzaniga, Ida Silvestri, Angela Gradilone and Anna Maria Aglianò. The increasing use of intravesical therapies for stage T1 bladder cancer coincides with decreasing survival after cystectomy. *BJU Int.* Jan;101(1):127, 2008.
- [2] 2 Gazzaniga P., Gradilone A., Vercillo R., Gandini O., Silvestri I., Napolitano M., Albonici L., Vincenzoni A., Gallucci M., Frati L. Aglianò A. M. bcl 2/bax mRNA expression ratio as prognostic factor in low grade urinary bladder cancer. *Int. J. Cancer* Apr. 22 69(2):100-104, 1996.
- [3] 3 Gazzaniga P., Gradilone A., Silvestri I., Gandini O., Giuliani L., Vincenzoni A., Gallucci M., Frati L., Aglianò A. M. Variable levels of bcl-2, bcl-X and bax mRNA in bladder cancer progression. *Oncology Reports*, Jul 5(4): 901-904, 1998.
- [4] 4 Gazzaniga P., Gradilone A., Giuliani L., Gandini O., Silvestri I., Nofroni I., Saccani G., Frati L., Aglianò A. M. Expression and prognostic significance of livin, survivin and other apoptosis related genes in the progression of superficial bladder cancer. *Annals Oncol.*, 2003 Jan;14(1):85-90.
- [5] 5 Gazzaniga P., Gradilone A., Naso G., Cortesi E., Gianni W., Frati L., Aglianò A. M. Chemoresistente profile of circulating tumor cells: toward a clinical benefit? *Int. J. Cancer* 2008, Oct 1;123(7):1730-2