



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

*DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIRURGICHE E
TECNOLOGIE DIAGNOSTICO - TERAPEUTICHE AVANZATE*

**XXII ciclo
Coordinatore: Prof. Andrea Renda**

INDIRIZZO COLO - RETTALE

Tesi di dottorato

**“L’IPERESPRESSIONE DEL C-MYC IN CONDIZIONI PRECANCEROSE E
NEL CARCINOMA DEL COLON - RETTO COME FATTORE DECISIONALE
NELL’ITER TERAPEUTICO MEDICO E CHIRURGICO”.**

Relatore
Ch.mo Prof. Andrea Renda

Candidato
Dott. Nikolaos Filiotis

ANNO ACCADEMICO 2008/2009

I. Indice	2
II. Generalita'	4
III. Introduzione	9
1. Epidemiologia	9
2. Carcinoma del colon-retto	12
3. Patogenesi Molecolare	14
4. C-Myc	20
5. Obiettivo della Tesi	23
IV. Materiali e Metodi	24

V. Risultati	30
1. Espressione del c-myc nei polipi adenomatosi	
2. Espressione del c-myc in Adenocarcinoma	
3. Espressione del c-myc in Rettocolite Ulcerosa	
VI. Discussione e Conclusioni	39
VII. Bibliografia	45

II. Generalita'

La ricerca di base in campo oncologico e' in grado, avvalendosi di metodiche di biologia molecolare, di studiare le macromolecole e le variazioni delle stesse in struttura ed espressione nelle cellule tumorali, rispetto alle cellule sane.

Gli studi vengono effettuati lungo tutto il flusso dell'informazione biologica: DNA, RNA e proteine.

A **livello genomico** la trasformazione neoplastica trova origine e mantenimento in variazioni della sequenza del DNA e in danni a livello del patrimonio genico che portano all'espressione di proteine aberranti e con il conseguente sconvolgimento dell'equilibrio dei processi cellulari che modificano radicalmente la fisiologia normale della cellula.

Anche lo studio della **trascrittomica** e' utile al fine di delineare il carattere anomalo delle cellule trasformate; l'alterata espressione e struttura dell'RNA messaggero sono il preludio alla genesi di proteine alterate, atipiche e/o ipo/iperesprese che portano a deregolazione del ciclo della cellula fino alla sua trasformazione in senso neoplastico.

Lo studio a livello di **espressione proteica** e' importante e fondamentale per comprendere le differenze tra cellule sane e tumorali

di uno stesso tipo di tessuto, in quanto ad esempio possono venire espresse dalle cellule tumorali proteine non proprie del tessuto di origine e presenti in altri tipi di tessuti. Il pattern di espressione proteico e' specifico per ogni tipo di cellula ed e' responsabile del corretto funzionamento della stessa.

Un pattern proteico alterato puo' essere sinonimo di trasformazione cellulare e neoplasia.

Interessanti conclusioni si possono trarre dal trovare il trascritto primario codificante per una certa proteina, ma non la proteina finale in quanto tale RNA codificante viene prematuramente degradato (**trascritto non tradotto**), oppure svolge ruoli di modulatore dell'espressione di altri geni.

Cio' puo' generare una ipoespressione proteica o addirittura una non espressione di proteine. Se tale evento si verifica in proteine importanti per il controllo del ciclo cellulare, per la riparazione dei danni al DNA, per l'apoptosi o per tutti quei fini e delicati meccanismi di salvaguardia fisiologici, avverra' una irreversibile trasformazione cellulare in senso patologico.

Sono due i fattori chiave che portano alla degenerazione neoplastica le cellule sane: l'iniziazione e la promozione, anche se

realmente occorrono piu' eventi trasformanti che in sinergia deviano la cellula dalla sua normale fisiologia, agendo in maniera simultanea o sequenziale e dando origine ad un processo a tappe (**multistep carcinogenesis**).

Bisogna tenere presente, pero' che alcuni individui sono predisposti geneticamente verso lo sviluppo di determinate patologie neoplastiche, in quanto nascono gia' portatori di alcune mutazioni a livello genomico, ma tali patologie potranno instaurarsi solo se l'ambiente fornira' i fattori e/o promuoventi (**eventi epigenetici**).

Gli **oncogeni** sono stati inizialmente identificati come elementi genetici veicolati specificamente da virus che potevano portare a trasformazione tumorale la cellula (v-onc). In seguito e' stato appurato che esistono degli oncogeni cellulari, chiamati **proto-oncogeni**, che svolgono funzioni fisiologiche specifiche e controllate (c-onc).

La loro mutazione o attivazione anormale e incontrollata e' causa dei difetti funzionali e delle devianze nel comportamento cellulare.

In particolare, essi svolgono funzioni importanti nell'embriogenesi, nei processi di moltiplicazione e differenziazione cellulare, di controllo stimolatorio del ciclo cellulare e di blocco dell'apoptosi.

I proto-concogeni si comportano come geni dominanti, infatti e' sufficiente una mutazione a livello di una copia allelica per determinare un fenotipo cellulare alterato.

Esistono diversi tipi di variazione genetica che possono trasformare un proto-oncogene in oncogene:

1. Mutazione della sequenza codificante per mutazione puntiforme:

puo' produrre una proteina iperattiva in quantita' normale. Esempio: mutazioni puntiformi del gene Ras.

2. Riarrangiamento cromosomico (traslocazione cromosomica):

accanto al gene si ritrova una sequenza regolatrice che causa una iperespressione della proteina normale, oppure si ha la fusione con un gene attivamente trascritto, che induce una forte espressione della proteina di fusione, oppure la proteina di fusione e' iperattiva.

Esempio: traslocazione cromosomica di c-myc dal cromosoma 8 al cromosoma 14 nel linfoma di Burkitt.

3. Amplificazione genica: la proteina e' normale ma iperespressiva in quanto il numero di copie del proto-oncogene e' aumentato. I geni amplificati possono essere visti sull'analisi citogenetica dove sono rappresentati da *regioni che si colorano omogeneamente* (HSR) o

elementi extracromosomiali (DM). Esempio: amplificazione di N-myc nei neuroblastomi.

4. Iper-espressione genica: Un gene bersaglio con ruolo chiave in determinate vie metaboliche, viene iper-espresso.

III. Introduzione.

1. Epidemiologia.

Il **cancro al colon** occupa il secondo posto per mortalità tumorale e il terzo nella donna. È più frequente in nord-America, Europa occidentale e Nuova Zelanda.

In Italia si osservano quaranta (40) nuovi casi ogni 100,000 mila abitanti, di cui la maggior incidenza si colloca tra la quinta e la settima decade di vita. L'80% dei casi di CRC è rappresentato dalle forme sporadiche (non connesse con mutazioni geneticamente acquisite).

Mentre il cancro del colon colpisce indiffertemente entrambi i sessi, per il cancro del retto si ha un rapporto maschi : femmine di circa 2 : 1.

Negli ultimi venti (20) anni si è assistito ad un progressivo aumento dell'insorgenza di CRC; tuttavia, grazie alla diagnosi precoce e all'evoluzione delle terapie, la sopravvivenza a cinque (5) anni è notevolmente aumentata.

Le sedi maggiormente colpite sono il retto (39%) e il sigma (25%), senza però risparmiare nessun distretto colo-rettale.

Stando alle proiezioni, nel 2012 la popolazione italiana sarà seconda solo a quella spagnola per il tasso di incremento annuale. I tassi di incidenza, così come quelle di mortalità, variano da regione a regione, ma innanzitutto tra nord e sud del paese.

Nel quinquennio 2000 - 2005, l'incidenza (maschi - femmine) per 100,000 mila abitanti, nelle città provviste di un Registro tumori validato è stata la seguente:

- Torino: 125,1 (25 casi/anno);
- Genova: 159,2 (31,8 casi/anno);
- Varese: 124 (25 casi/anno);
- Parma: 149,6 (29,9 casi/anno);
- Firenze: 154,4 (30,8 casi/anno);
- Latina: 67,9 (13,6 casi/anno).

I motivi che possono spiegare questa differenza sono da ricercare, principalmente, nell'influenza del regime alimentare.

È ormai acquisito, infatti, che una dieta ricca di cereali, fibre, verdure e povera di grassi animali esplicherebbe un'azione protettiva nei confronti di questa neoplasia.

Nelle regioni del nord rispetto a quelle del sud si consumano piu' proteine animali e meno fibre, sebbene in questi ultimi tempi queste differenze tendano progressivamente a ridursi: l'utilizzo, espresso in grammi/die pro capite dei cereali e' di 238 g rispetto ai 321 g del sud;

Delle proteine animali di 109 g rispetto ai 92 g; dei grassi animali di 121 g rispetto ad 84 g e delle fibre di 87 g rispetto ai 106 g del sud.

Le percentuali di mortalita' per cancro del colon-retto nelle stesse citta', e nello stesso quinquennio, e' la seguente:

- Torino: 68,8 (13,7 casi/anno);
- Genova: 87,7 (17,5 casi/anno);
- Varese: 49,1 (9,8 casi/anno);
- Parma: 75,7 (15,1 casi/anno);
- Firenze: 68,6 (13,7 casi/anno);
- Latina: 4,9 (10 casi/anno).

2. Carcinoma del colon - retto.

Il CRC in gran parte originano da polipi adenomatosi, il cui rischio di cancerizzazione e' stimabile a seconda delle caratteristiche anatomopatologiche: i polipi sessili, infatti, hanno maggior rischio di trasformazione maligna rispetto a quelli peduncolati, e, dal punto di vista istologico, un pattern villosa e' piu' rischioso di un pattern tubulare.

Allo stesso modo, dimensioni superiori correlano con un maggiore rischio di trasformazione (diametro > 2,5 cm → rischio 10%).

Si registrano 1,000,000 di nuovi casi/anno al mondo, dei quali 40,000 mila in Italia, dati che negli ultimi anni hanno registrato un aumento considerevole; la percentuale di pazienti sopravvissuti a 5aa e' il 50%, grazie al fatto che e' possibile fare diagnosi precoce.

Buona parte dei CCR si presenta in maniera sporadica: sono pochi quelli su base ereditaria.

Il rischio di contrarre il CCR e' del 5% nell'arco della vita, se si considerano individui della popolazione generale; vi sono due tipi di fattori predisponenti:

Fattori esogeni, quali le abitudini di vita (un'alimentazione a basso contenuto di scorie (poche fibre) e' rischiosa, perche' le fibre, aumentando il volume fecale e trattenendo acqua, diluiscono le sostanze

cancerogene contenute nella dieta, fermentano gli acidi grassi a catena corta, rendono piu' rapido il transito delle feci e legano gli acidi biliari, riducendo la possibilita' di irritazione della mucosa intestinale.

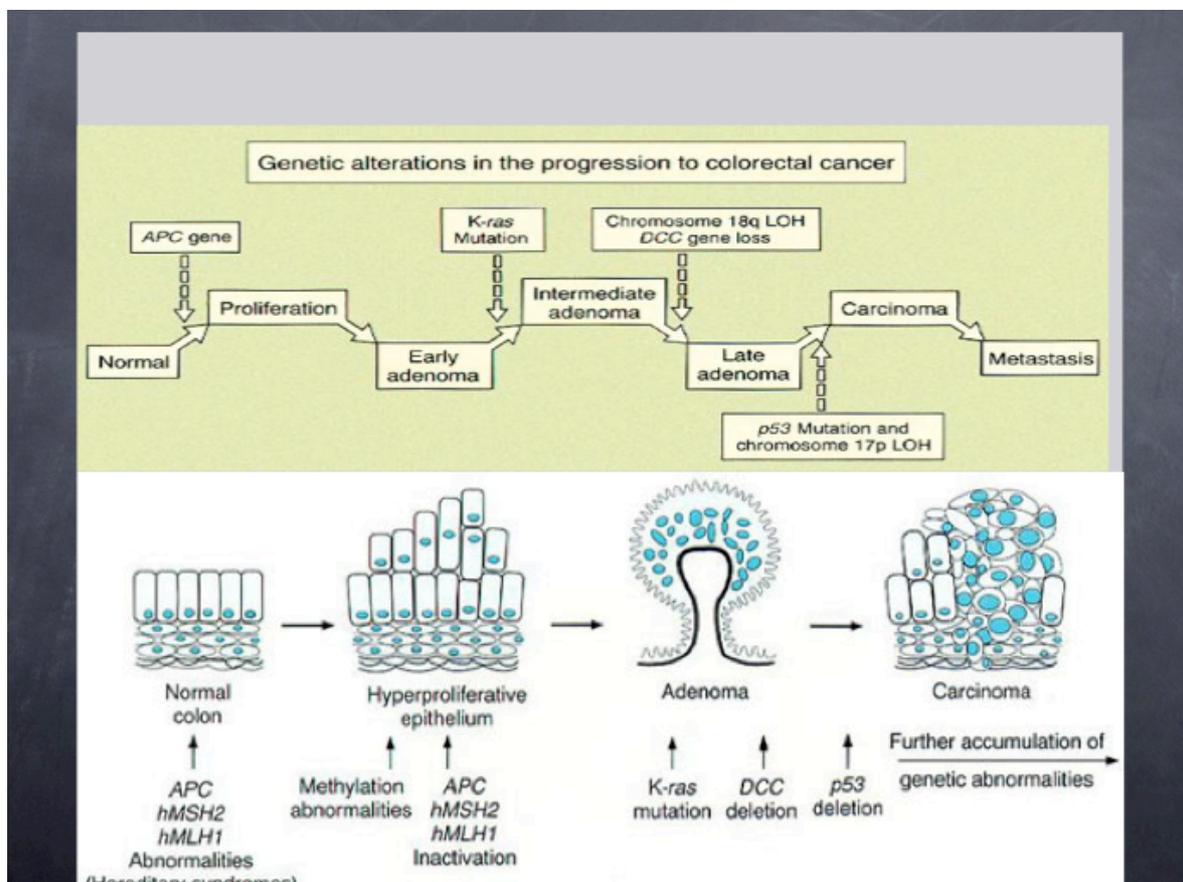
Inoltre, si e' visto che un razionale consumo di calcio puo' essere preventivo, inibendo la proliferazione dell'epitelio nell'uomo) oppure le infiammazioni croniche della mucosa intestinale (rettocolite ulcerosa, morbo di Crohn, morbo celiaco senza dieta priva di glutine).

Fattori ereditari: si e' osservato che i fratelli di un paziente con CCR hanno probabilita' di ammalarsi pari alla popolazione se la patologia e' insorta dopo 60aa, ma maggiore di cinque (5) volte se e' insorta prima dei 60aa.

3. Patogenesi Molecolare

Eventi molecolari multipli sono responsabili della trasformazione dell'epitelio intestinale normale, in epitelio neoplastico. Sono necessari danni genetici multipli in un processo patogenetico definito

“**MULTISTEP**”. Le diverse vie molecolari non sono necessariamente sequenziali.



L'elemento chiave, determinante per il passaggio dalla mucosa normale alla neoplasia maligna, consiste nell' associazione di mutazioni

multiple. I geni coinvolti nella carcinogenesi colo - rettale, sono i seguenti:

- a. gli oncosoppressori,
- b. gli oncogeni,
- c. i geni riparatori del DNA.

In rapporto al tipo di geni coinvolti, si riconoscono sia nel CRC sporadico, che in quello ereditario, due principali vie molecolari, determinanti per l'insorgenza della neoplasia:

i) L' **85%** dei casi e' la conseguenza di eventi che determinano instabilita' cromosomica (CIN), aneuploidia, e perdita di parti del cromosoma 5q, 18q e 17p, e mutazione degli oncogeni kRAS, c-myc.

I geni coinvolti nelle perdite cromosomiche sono APC(5q), DCC/MADH2/MADH4(18q) e P53(17p).

ii) Il **15%** dei casi, e' conseguenza di eventi che determinano instabilita' microsatellitare (MIN); il cromosoma risulta intatto, ma esistono difetti del "**DNA mismatch repair**", instabilita' mitotica del microsatellite; e' il segno specifico dei "**MIN cancers**".

- Aumento dell'espressione degli oncogeni (basta anche una mutazione puntiforme su un solo alleli), ad es. K-ras (cr. 18, mutazioni

puntiformi nei 40-70% dei carcinomi) o c-myc (iperespressione nel 60-70% dei carcinomi).

- Diminuzione dell'espressione degli oncosoppressori (in attivazione di entrambi gli alleli per delezione: concetto del *doppio colpo*, o LOH, loss of heterozygosity), ad es. APC (cr. 5, perdita all'elica del 20-50% dei carcinomi), p53 (cr. 17, perdita all'elica nel 75% dei carcinomi, rara negli adenomi) o MMG (cr. 5).

- Metilazione del DNA.

Nel CCR si e' ipotizzato il seguente meccanismo:

- Inattivazione oncosoppressore APC (cr. 5) → piccolo adenoma.
- Attivazione oncogene Ras (cr. 18) → grande adenoma con displasia.

- Inattivazione p53 (cr. 17) → cancro.

- Altre anomalie a carico dei *mismatch repair genes* → metastasi.

Le mutazioni causate dagli eventi trasformanti si verificano alterando e sconvolgendo la struttura e la funzione non solo dei proto-oncogeni (che diventano oncogeni), ma anche dei geni **onco-soppressori**.

Tali geni, denominati anche anti-oncogeni, svolgono un ruolo importante e fondamentale nel controllo di tipo inibitorio del ciclo cellulare (e quindi della crescita cellulare), ma anche nell'effettuare

riparazioni a livello del DNA danneggiato, nel regolare la trascrizione genica e nell'indurre l'apoptosi.

Un funzionamento anomalo delle proteine codificate da questi geni porta ad alterazioni nel controllo della proliferazione cellulare tali da permettere un'espansione clonale della cellula trasformata.

I geni onco-soppressori si comportano come geni recessivi, ovvero per indurre una trasformazione fenotipica patologica e' necessario che entrambe le copie alleliche siano mutate.

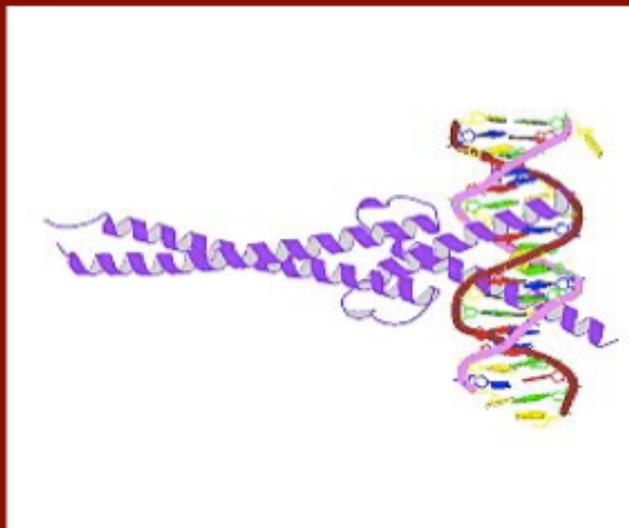
I geni onco-soppressori e i proto-oncogeni svolgono funzioni vitali e fisiologiche nel controllo del ciclo cellulare.

TABELLA 3.1 - Principali geni oncosoppressori umani e rispettive mutazioni inattivanti.	
APC	Delezione/Nonsense/Missenso
BRCA1/BRCA2	Nonsense/Missenso/Delezione
DCC	Delezione/Nonsense
DPC4	Nonsense/Delezione/Missenso
MTS1	Delezione/Nonsense/Missenso
NF1	Delezione/Nonsense
SNF5/INI1	Frameshift/Nonsense/Missenso/RNA editing
TP53	Missenso
VHL	Delezione/Missenso
WT1	Missenso/Nonsense/Frameshift/Splicing anomalo

Come alterazioni qualitative e quantitative dei fattori che presiedono il controllo del ciclo cellulare a monte si riflettano direttamente sul ciclo stesso, causando un'alterata proliferazione cellulare: l'acquisizione di un'autonomia proliferativa e' uno degli eventi fondamentali nel processo di trasformazione neoplastica.

La trasformazione neoplastica in termini molecolari, deriva dall'alterazione funzionale dei proto-oncogeni e dei onco-sopressori tale da stimolare l'azione dei primi e reprimere l'azione dei secondi, in particolare, inibire i freni del ciclo cellulare e gli stimoli pro-apoptotici.

bHLH domain, in c-myc protein, that binds to
DNA

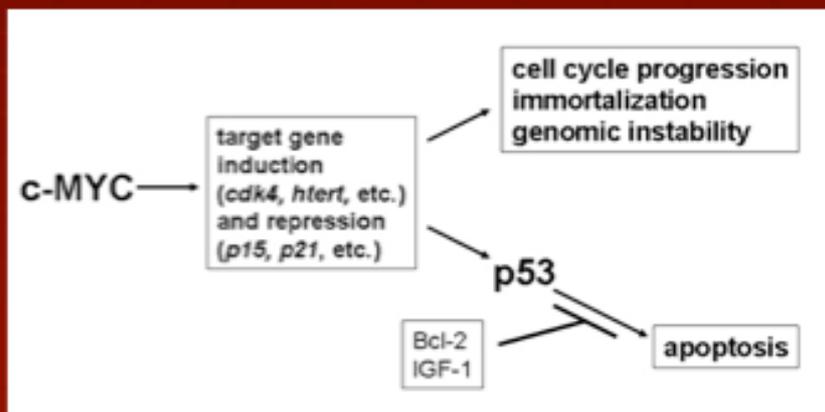


Tali mutazioni nel complesso portano ad un fenomeno sinergico, irreversibile e drammatico con il conseguente quadro alterato e aberrante del ciclo cellulare. E' l'inizio della neoplasia.

4. C-Myc

Uno degli oncogeni che si sono dimostrati più espressi in vari tipi di tumore, è stato l'oncogene c-myc. Da prima scoperto nelle traslocazioni del cromosoma 8 che si verificano nel linfoma di Burkitt, la sua ricerca in vari tipi di tumore ha messo in evidenza la sua over-espressione in diverse forme neoplastiche.

C-myc's activation is present in many biologic pathways, through the expression target gene



La proteina c-myc appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione (che includono anche n-myc e l-myc); tale famiglia contiene un dominio bHLH (basic Helix-Loop-Helix: elica-uncino-elica) che permette alla

proteina di legarsi al DNA: tale legame attiva l'espressione di un gran numero di geni tramite in quanto avviene su una serie di sequenze consenso (Enhancer Box sequences: E-boxes).

Inoltre il c-myc attiva il reclutamento dell'acetiltransferasi istonica. Questa proteina agisce anche come un repressore della trascrizione. C-myc e' attivato in vari segnali mitogeni come Wnt, Shh, e EGF (tramite la via MARK/ERK).

Tramite la modificazione dell'espressione dei suoi geni target, l'attivazione di c-myc e' presente in numerosi processi biologici: il primo ad essere scoperto e' stata la sua capacita' di indurre la proliferazione cellulare (con la *up regulation* delle cicline e la *down regulation* della proteina p21), ma gioca anche un importante ruolo nella regolazione della crescita cellulare (sovrastimolando RNA ribosomiale e le proteine), l'apoptosi (sovrastimolando Bcl-2), la differenziazione e l'auto-rinnovamento delle cellule staminali. Da cio' si deduce come c-myc sia un oncogene veramente forte.

Nuove scoperte avrebbero messo in risalto come il c-myc sia importante per l'aumento della attivita' del glutathione (GSH), che svolge ruolo importante per lo stato ossidativo della cellula: questo meccanismo sembra importante per indurre resistenza agli stress ossidativi delle

cellule in continua riproduzione (secondo un recente studio l'aumento della produzione di GSH sarebbe un meccanismo attuato da c-myc per resistere agli stress ossidativi indotti dai farmaci chemioterapici).

5. Obiettivo della Tesi

Lo scopo della presente tesi e' di:

- Contribuire alla conoscenza dei meccanismi dello sviluppo tumorale, a livello del colon - retto, e nel medio termine, esplorare nuove strategie terapeutiche, in campo medico e in campo chirurgico.
- Studio, dei meccanismi di genesi e progressione del tumore del colon-retto.
- Validazione, di specifici trattamenti di chemioprevenzione, nel campo delle malattie infiammatorie croniche.
- Identificazione e validazione di biomarcatori, utili per distinguere sotto gruppi di pazienti con lesioni predisponenti (RCU), e preneoplastiche (adenomi coloretali), ad alto rischio di progressione tumorale.
- Lo studio della espressione del gene C-myc, come possibile marker tumorale e di progressione della patologia neoplastica, con un proprio valore diagnostico/prognostico, e come vero e proprio bersaglio molecolare nella terapia medico o chirurgica delle neoplasie colo-rettali.

IV. Materiali e Metodi.

Sono stati arruolati allo studio, centodicianove (119) pazienti, che sono stati selezionati e seguiti presso l'Unità di Oncologia Clinica, e il reparto di Chirurgia Generale "V. Oliva", del Policlinico Universitario di Bari, per un periodo di tre (3) anni, cioè dal Giugno 2006 fino ad Agosto 2009, di età compresa dai ventisei (26) fino ai ottantasei (86) anni, settantaquattro (74) di sesso maschile e quarantacinque (45) di sesso femminile.

Al momento della selezione, nessun paziente aveva avuto trattamento chemioterapico, radioterapico e/o trattamento farmacologico per le malattie infiammatorie croniche dell'intestino, e risultarono liberi da qualsiasi patologia autoimmune.

I campioni bioptici su resecati chirurgici e/o bioptico raccolto durante interventi chirurgici e/o endoscopie, effettuate a scopo diagnostico o terapeutico e' stato immediatamente congelato in azoto liquido e conservato a - 80°C fino la sua elaborazione.

Le sezioni di tessuto parafinato di 4mm sono sottoposte al trattamento deparaffinizzante e quindi incubate con H₂O₂ per abolire attività perossidasi endogena. Le sezioni sono poi incubate con lo

specifico anticorpo primario. Sono stati utilizzati anticorpi monoclonali, anti-myc (mouse monoclonal antibody H120C69 e H8C150).

Si è effettuata l'estrazione dell' RNA totale dai tessuti congelati. I tessuti congelati sono omogeneizzati in presenza del reagente "Trizol" e l'RNA totale estratto dopo centrifugazione, si è utilizzato per l'analisi mediante RT-PCR semiquantitativa.

L'RNA è stato quantizzato mediante letture spettrofotometrica a 260nm e analizzato su gel denaturante di agarosio/formaldeide, per valutarne la qualità.

Si è utilizzata la metodica di Western Blot analisi della myc protein. Gli estratti proteici dopo denaturazione al calore (5', 100°C), sono stati separati mediante elettroforesi su gel di SDS -poliacrilammide.

Le proteine sono state trasferite elettroforeticamente su membrana di nitrocellulosa (PVDV Immobilon-P, Millipore) (1h a 4°C, 100V) ed i filtri incubati con una soluzione al 5% di latte in PBS contenente 0.1% Tween per 45' a temperatura ambiente.

Successivamente, i filtri sono stati incubati nella stessa soluzione contenente l'opportuna diluizione (1:100 - 1:1000) di anticorpo primario. I filtri sono stati lavati tre (3) volte per 5' con una soluzione di TBS-Tween 0.1% (NaCl 150mM, Tris 10mM pH8) coniugato a perossidasi di rafano

diluito 1:3000 per 45' a temperatura ambiente. Si ripetono tre (3) lavaggi con l'anticorpo primario. Le proteine sono state infine rivelate utilizzando un sistema di chemiluminescenza, ECL (Enhanced ChemiLuminescence, Amersham).

- IMMUNOFISSAZIONE con Western Blotting si e' utilizzato per misurare l'espressione proteica del c-myc in campioni bioptici.

Il gene c-myc si e' considerato iperespresso quando e' superiore a 4 - fold per evitare falsi positivi.

Lo studio che prevede la ricerca su campioni bioptici, del c-myc (quantitativa dell'oncogene o della proteina sintetizzata dallo stesso) si e' condotto su tre (3) tipologie di pazienti:

1. Pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche di grado moderato - severo (in particolare la rettocolite ulcerosa (RCU) ritenuta una tra i maggiori fattori di rischio per il carcinoma del colon - retto);
2. Pazienti che presentano polipi adenomatosi del colon (divisi in polipi adenomatosi senza displasia, con basso grado di displasia e con alto grado di displasia - carcinoma in situ) e pazienti affetti da poliposi familiare del colon;
3. Pazienti affetti da adeno - carcinomi con diversa stadiazione di *Dukes* modificata secondo Astler - Coller, con la ricerca

dell'espressione del c-myc sia sull'area neoplastica sia sulle aree circostanti in mucosa indenne.

Oltre alla ricerca di c-myc sui pazienti neodiagnosticati, si e' affettuato un follow - up breve, controlli a distanza di sei (6) mesi dal primo riscontro della patologia, come tra l'altro prelievi di controllo dopo il trattamento terapeutico, medico nei pazienti affetti da RCU, (terapia iniziale a base di mesalazina ad alte dosi), o chirurgico (asportazione endoscopica dei polipi o resezione con eventuale emicolectomia nel caso dei carcinomi).

Sono stati biopsizzati (polipectomia) quarantotto (48) pazienti con polipi intestinali, tra cui:

- Quattro (4) pazienti con patologia di poliposi familiare (FAP).
- Ventinove (29) pazienti con polipi intestinali adenomatosi con dimensioni inferiori di 2 cm (0,4 - 1,2 cm).
- Dieci (10) pazienti con polipi adenomatosi di dimensioni tra 0,6 - 2,2 cm con displasia di basso grado.
- Cinque (5) pazienti con polipi adenomatosi di dimensioni tra 1,5 cm - 3,5 cm con displasia di alto grado .

Si e' misurata l'espressione della proteina c-myc nelle formazioni polipoidi asportate, e nell'area circostante dopo la polipectomia.

Sono stati selezionati diciannove (19) pazienti affetti da malattia infiammatoria cronica (RCU) in fase acuta, dal grado moderato al grado severo, non in trattamento farmacologico.

Dodici (12) di questi pazienti di sesso femminile, e sette (7) pazienti di sesso maschile, di età compresa fra i ventisei (26) e quarantacinque (45) anni.

Sono stati effettuati campioni biotici multipli.

Misurata l'espressione del c-myc dopo aver iniziato il trattamento con *mesalazina* (pieno dosaggio da 2,4gr/die - 4,8gr/die), ogni sei (6) mesi.

Sono stati esaminati cinquantadue (52) pazienti affetti da neoplasia del colon-retto, di diverso stadio, in base alla classificazione di Astler - Coller:

- Cinque (5) pazienti con neoplasia in fase B1,
- Otto (8) pazienti con neoplasia in fase B2,
- Quindici (15) pazienti in fase C1,
- Sedici (16) pazienti in fase C2,
- Otto (8) pazienti in fase D,

nei quali sono stati effettuati biopsie anche alle metastasi a distanza a livello epatico.

Sono state effettuate biopsie e misurazioni dell'espressione del c-myc anche nelle aree circostanti della neoplasia in tessuto intestinale sano, da 2cm - 5cm dal limite della neoplasia, in normale epitelio intestinale.

In tutti i pazienti affetti da neoplasia a livello intestinale, sono stati applicati i trattamenti chirurgici necessari, e sono stati trattati con chemioterapia per via endovenosa, con 5FU.

Sono stati eseguiti campioni biotici e misurazioni del c-myc, a livello dell'anastomosi intestinale, in pazienti sottoposti all'intervento chirurgico a distanza di sei (6) mesi.

V. Risultati

Notevole importanza presenta la misurazione dell'espressione della proteina c-myc, ricercata in mucosa intestinale normale, a distanza di 2cm - 5cm dal limite della neoplasia.

Sono stati esaminati cinquantadue (52) pazienti affetti da neoplasia colon - rettale.

Si e' evidenziata positività dell'espressione del proto-oncogene c-myc, nel 30% dei casi (diciassette (17) pazienti con livelli da 6 - 12 fold).

L'espressione del c-myc e' anomala, in mucosa intestinale apparentemente normale, adiacente al carcinoma del colon-retto.

Nonostante la mucosa si presenta istologicamente nella norma, il c-myc ha la stessa percentuale di iperespressione, presente nei polipi adenomatosi senza displasia (6 - 13 fold).

1. Espressione del c-myc nei polipi Adenomatosi

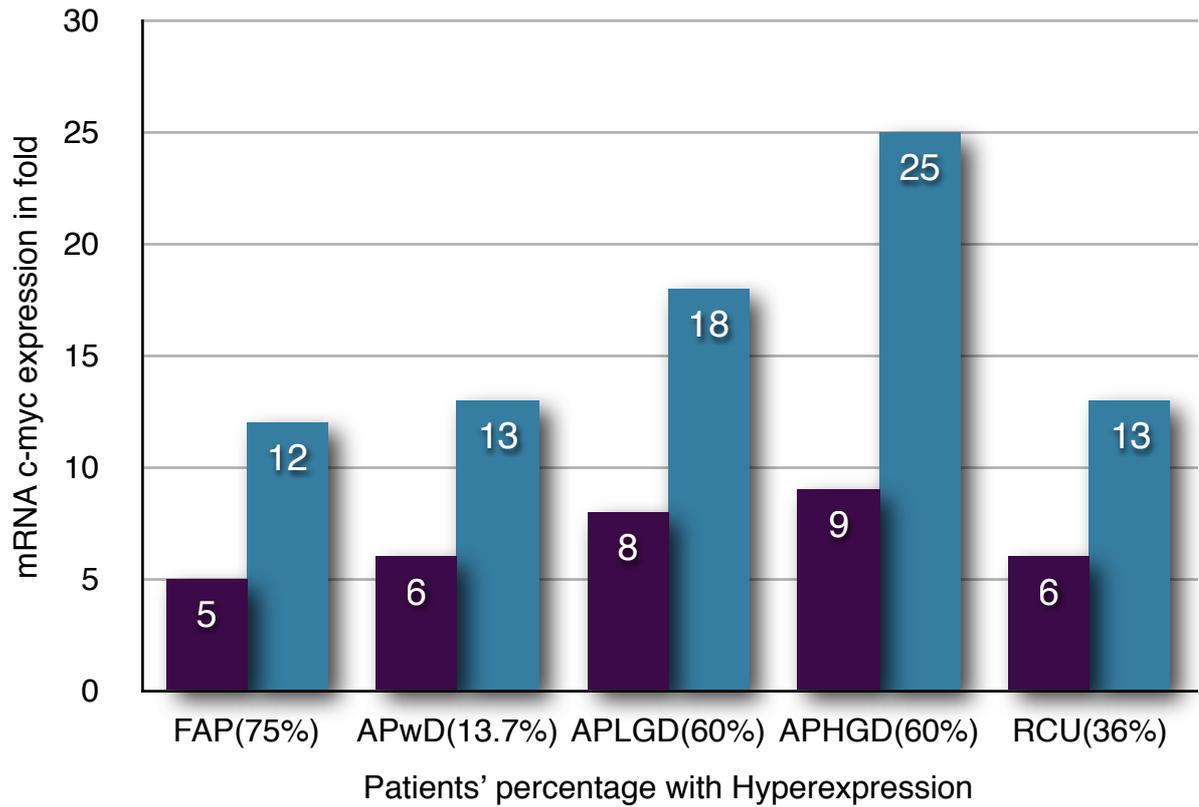
I polipi adenomatosi, presumibilmente precursori del adenocarcinoma intestinale, sono stati esaminati in quarantotto (48) diversi pazienti. Tra cui:

- Quattro (4) pazienti, affetti da FAP; in tre (3), (il 75%) di questi pazienti si e' notato l' iperespressione del c-myc con valori da 5 - 12 fold.
- In ventinove (29) pazienti con polipi adenomatosi iperplastici di dimensioni da 0,4 - 1,2cm, senza displasia, si e' trovata iperespressione del gene c-myc; in quattro (4), (il 13,7%) dei pazienti con valori del c-myc da 6 - 13 fold.
- In dieci (10) pazienti con polipi di dimensione 0,6cm - 2,2cm con esame istologico di polipi tubulo-villosi e villosi con basso grado di displasia si e' evidenziato iperespressione del protooncogene c-myc; in sei (6) (il 60%) dei pazienti con valori del c-myc da 8 - 18 fold.
- Cinque (5) pazienti con polipi di dimensioni tra 1,5cm - 3,5cm, con esame istologico villosa e tubulo-villosa con alto grado di displasia; in tre (3), (il 60%) di questi casi si e' trovata l' iperespressione del c-myc da 9 - 25 fold.

C-myc Expression in colorectal adenomatous polyps: Northern analysis of mRNA and immunoistochemical staining of myc protein

	N. Patients	Size	c-myc expression	
			normal	overexpressed
Polypoid adenomas	48			
in FAP	4		1	3 (5-12 fold)
without dysplasia	29	(0,4 – 1,2cm)	25	4 (6-13 fold)
with low grade dysplasia	10	(0,6 – 2,2cm)	4	6 (8-18 fold)
with high grade dysplasia	5	(1,5 – 3,5cm)	2	3 (9-25 fold)

Si e' notato che biopsie effettuate adiacente ai polipi adenomatosi con iperespressione del c-myc su mucosa intestinale di morfologia normale presentano valori di espressione del c-myc nella normalita'.



- FAP: Familiar Adenomatous Polyposis,
- APwD: Adenomatous Polyps without Dysplasia,
- APLGD: Adenomatous Polyps with Low Grade Dysplasia,
- APHGD: Adenomatous Polyps with High Grade Dysplasia,
- RCU: Ulcerative Rectal Colitis.

2. Espressione del c-myc in Adenocarcinoma

Sono stati esaminati cinquanta (52) pazienti affetti da adenocarcinoma del colo-retto, tra qui diciannove (19) femmine e trentatre' (33) maschi, da quarantadue (42) a ottantasei (86) anni.

Si e' misurata l'espressione della proteina c-myc con la metodica immunohistochemica, utilizzando gli anticorpi monoclonali antimouse **H8C150** e **H120C69**. Tutti i pazienti sono stati classificati in gruppi secondo Astler - Coller.

Results			
	N. Patients	c-myc expression	
		normal	overexpressed
Colorectal cancer (Astler-Coller classification)	52 (19 F – 33 M)		
B1	5	2	3 (9-25 fold)
B2	8	3	5 (11-28 fold)
C1	15	5	10 (9-30 fold)
C2	16	4	12 (18-36 fold)
D	8	2	6 (24-39 fold)
Metastasis	8	2	6 (22-41 fold)

Dai cinque (5) pazienti nello stadio B1, tre (3), (il 60% dei pazienti) hanno avuto iperespressione del c-myc mRNA (9 - 25 fold).

Dagli otto (8) pazienti nello stadio B2, cinque (5), (il 62% dei pazienti) hanno avuto iperespressione del c-myc (11 - 28 fold).

Dai quindici (15) pazienti nello stadio C1, dieci (10) (il 66% dei pazienti) hanno avuto iperespressione del c-myc (9 - 30 fold).

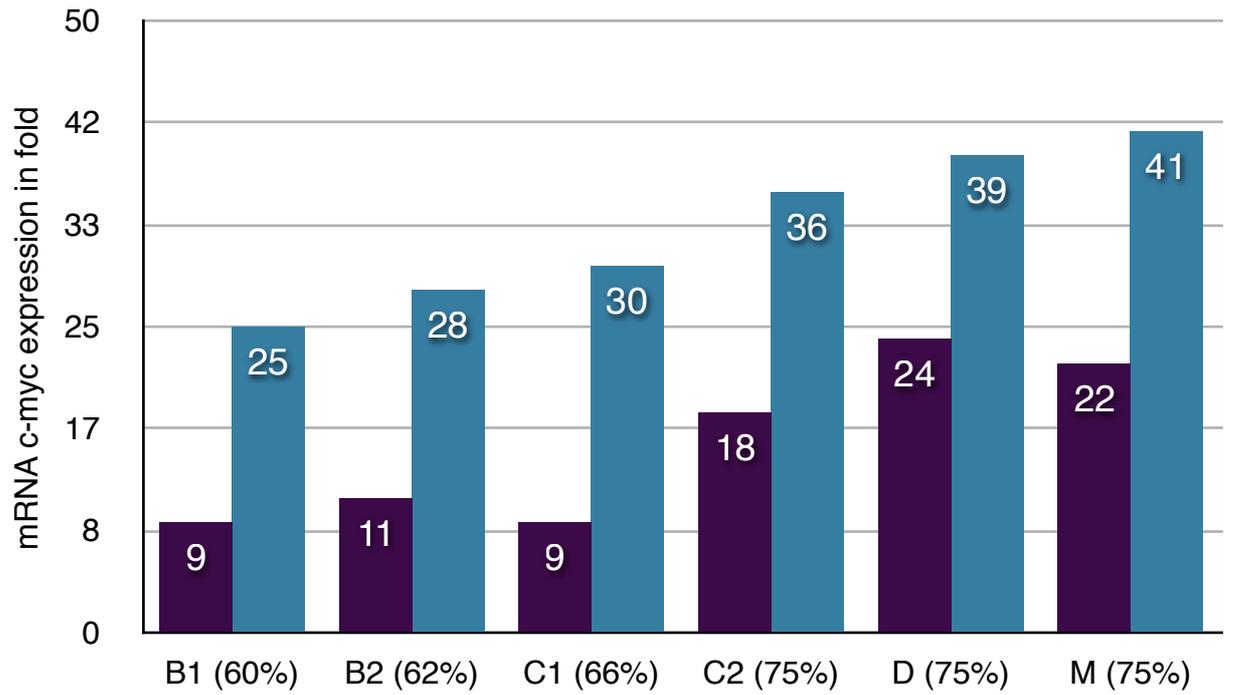
Dai sedici (16) pazienti nello stadio C2, dodici (12) (il 75% dei pazienti) hanno avuto iperespressione del c-myc (18 - 36 fold).

Alla fine, in un numero ridotto di pazienti diagnosticati, otto (8) nello stadio D, sei (6) (il 75% dei pazienti) presentavano iperespressione del c-myc (24 - 39 fold).

Sugli stessi ultimi pazienti, le biopsie delle metastasi epatiche ha evidenziato quasi lo stesso livello dell'iperespressione del c-myc (22 - 41 fold).

Sono state eseguite biopsie, dopo trattamento chirurgico, a livello dell'anastomosi, a distanza di sei (6) mesi.

Si e' presentato normale il livello dell'espressione della proteina c-myc.



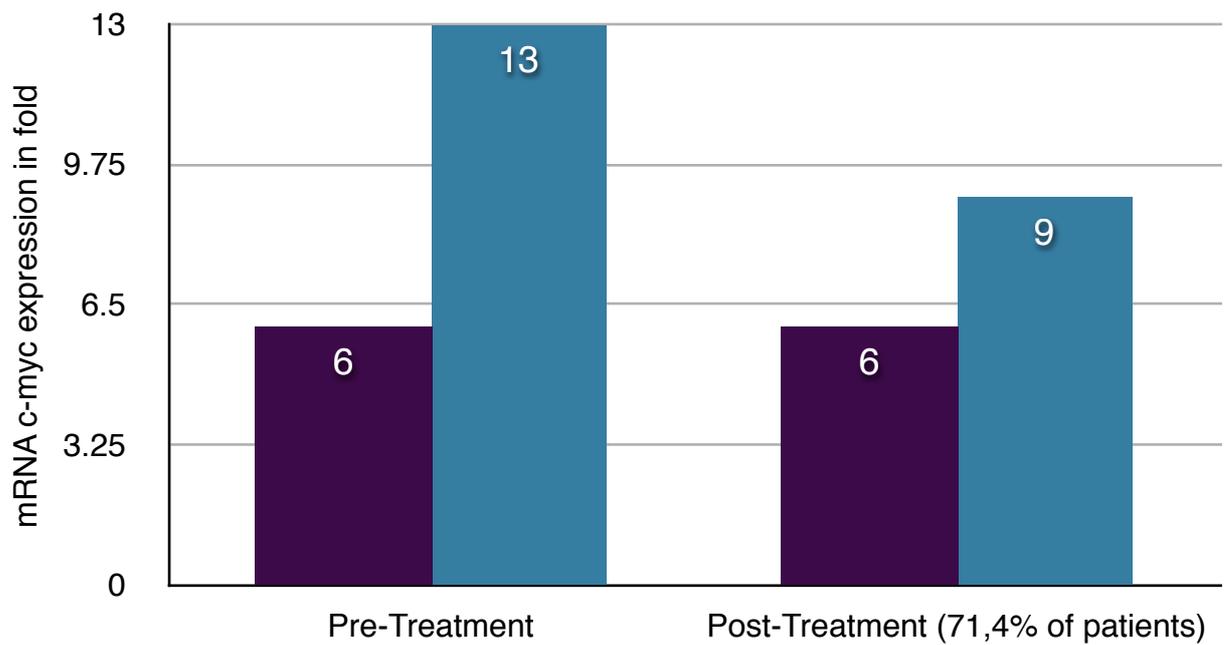
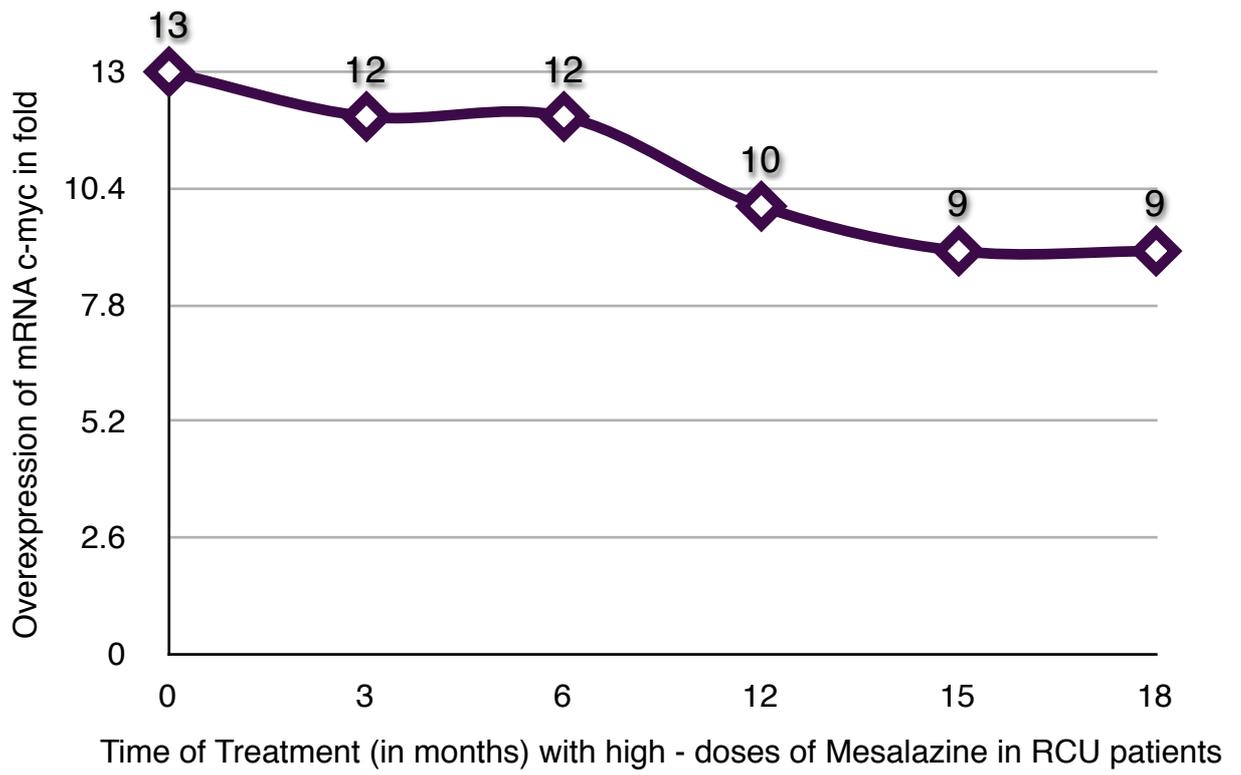
Patients' percentage with Colorectal Cancer (Astler - Coller) Hyperexpression of c-myc

3. Espressione del c-myc in Rettocolite Ulcerosa

Sono stati studiati diciannove (19) pazienti affetti da rettocolite ulcerosa, di cui undici (11) pazienti, affetti da RCU di grado moderato, e otto (8) pazienti di grado severo.

I campioni biotici multipli effettuati, hanno evidenziato iperespressione del c-myc mRNA da 6 - 13 fold in sette (7) di questi pazienti; cinque (5) pazienti con RCU severa e due (2) pazienti di grado moderato.

Questi ultimi, sette (7) pazienti, sono stati seguiti, per un periodo di follow up fino a 18 mesi, con ripetuti campionamenti biotici, mentre erano in trattamento farmacologico con alte dosi di mesalazina, che si è dimostrato una significativa riduzione dell'espressione c-myc mRNA, fra 6 - 9 fold, in cinque (5) (il 71,4%) dei pazienti.



VI. Discussione e Conclusioni

Numerosi studi Internazionali, con la metodica immunoistochimica, hanno evidenziato un'iperpressione del c-myc mRNA in 2/3 dei casi di carcinoma colon rettale.

Iperpressione del c-myc mRNA si verifica inoltre in circa 2/3 dei polipi adenomatosi.

Nel nostro studio, circa il 69% dei casi esaminati con adenocarcinoma, in diversi stadi della classificazione Astler - Coller, si è evidenziata, iperpressione della proteina c-myc (9 - 39 fold), superiore in paragone alla mucosa colica normale.

Inoltre è importante sottolineare che, l'iperpressione del c-myc protein è in relazione con la progressione dello stadio della neoplasia e in aumento con l'aumento della stadiazione della neoplasia.

Da diversi studi pubblicati recentemente, si nota che non c'è correlazione fra i livelli espressi del c-myc mRNA, con la differenziazione istopatologica dell'adenocarcinoma colon - rettale.

Nel nostro studio inoltre, solo il 30% dei polipi adenomatosi con diverso grado di displasia, hanno dato come risultato, un'aumento dell'espressione del protooncogene c-myc.

Iperespressione della C-Myc nella Mucosa normale circoferenziale al Tumore.

Adiacente all'adenocarcinoma, la mucosa colo - rettale, appare istologicamente normale. Nel 30% dei casi, l'analisi immunohistochemica della mucosa con anticorpi anti c-myc, evidenzia l'alterazione dell'espressione della mRNA c-myc. Simili risultati sono evidenziati in altri studi, per gli protooncogeni c-erb B2.

Possono esserci due (2) spiegazioni per questo fenomeno:

- **Prima ipotesi:** il tessuto direttamente adiacente al tumore, non e' normale, ma puo' presentare alterazioni molecolari, delle quali non esistono evidenze istologiche. Forse si tratta di espansione clonale di lesioni geneticamente predisponenti, dalle quali il tumore ha preso origine.

- **Seconda ipotesi:** la neoplasia secerne fattori di crescita capaci di attivare l'espressione genica delle cellule normali situate nella mucosa colica adiacente, aumentando la possibilita di trasformazione neoplastica.

In ogni caso l'iperespressione del c-myc nelle aree adiacenti la neoplasia e' una considerazione importante per la sicurezza della

radicalita' oncologica dopo il trattamento chirurgico (rima dell'anastomosi), o dopo le polipectomie di polipi con displasia grave, parametro da considerare per il follow - up dei pazienti.

Riduzione dei livelli del C-myc dopo trattamento con mesalazina in RCU.

La regolare somministrazione della mesalazina e' associata con la riduzione del rischio di sviluppo di neoplasie colo - rettali in pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche dell'intestino.

Il preciso meccanismo di azione molecolare del farmaco, ancora non e' sufficientemente noto. La mesalazina e' identificata come agente chemioprotettivo nella profilassi delle neoplasie colo - rettali, perche' ha effetti proapoptotici e antiproliferativi sulle cellule della mucosa intestinale.

Numerosi studi epidemiologici e *preliminari trials chimici*, affermano che alterazioni cromosomiche e instabilita' microsatellitari in displasia si riducono dopo "*long - term*" terapia con alte dosi di mesalazina per via orale, o con trattamento loco regionale tramite clisteri.

L'azione anticarcinogena si può attribuire sull'inibizione della cascata dell'infiammazione (cyclooxygenase - 1 e cyclooxygenase - 2) e sulla regolazione della proliferazione cellulare tramite la formazione delle prostaglandine, con l'aumento della apoptosi e diminuzione della proliferazione cellulare.

Si suppone che, trattamenti farmacologici con 5 - ASA, riducono il rischio dello sviluppo delle neoplasie colon - retali con il meccanismo di attivazione del recettore PPAR (Peroxisome Proliferator - Activated Recettor), che con meccanismi molecolari, induce l'apoptosi.

Inoltre nelle cellule della mucosa intestinale in pazienti con RCU che presentano displasia con iperespressione del protooncogene c-myc si evidenzia una significativa riduzione dell'iperespressione del c-myc associata con il trattamento farmacologico con 5 - ASA.

Iperespressione del C-myc nei polipi adenomatosi

Un'altra considerazione importante, dedotta dal nostro studio, è il livello dell'espressione del c-myc protein nei polipi adenomatosi con displasia grave, risulta circa sui stessi livelli con l'adenocarcinoma in

stadio B1, risultato che fa notare, che il danno genetico a livello cellulare, e' gia instaurato quando abbiamo il polipo adenomatoso con displasia grave e l'evoluzione verso l'adenocarcinoma e' presumibilmente unidirezionale.

Risulta normale l'espressione del protooncogene nel tessuto sano circonfenziale ai polipi adenomatosi. Prendendo nota anche i livelli dell'iperpressione del c-myc protein nei polipi adenomatosi con basso grado di displasia, e/o senza displasia, e nei pazienti affetti da rettocolite ulcerosa, si pensa che l'iperpressione del c-myc, e' un evento precoce nella trasformazione neoplastica del colon retto.

Parametro che si puo' individuare come fattore prognostico per i pazienti a rischio in trattamento farmacologico; per le patologie pre neoplastiche del colon - retto; per le nuove strategie terapeutiche in ambito di chemioprevenzione, chemioterapia e nell'ambito chirurgico.

L'iperpressione del protooncogene c-myc e' una condizione importante, e non un evento sufficiente per la trasformazione neoplastica della cellula. Il cancro del colon - retto cosi' come altre forme neoplastiche origina da cellule esposte ad una moltitudine di "insulti genotossici" in grado di forzare la cellula verso una proliferazione colonale incontrollata.

Si stima che nel colon - retto occorrono da tre (3) a otto (8) “mutazioni chiave” per la trasformazione di una cellula normale in una neoplastica. E’ un processo “multistep” anche da punto di vista genetico.

Da punto di vista chirurgico, non siamo ancora in grado di proporre significative variazioni alle tecniche del trattamento fin qui consolidate.

Almeno fin quando non verranno perfezionate diagnosi sicure del tipo Bio-molecolare che per altre forme neoplastiche , come per i cancri della mammella e i tumori midollari dello tiroide, potrebbero consigliare trattamenti chirurgici preventivi anche di tipo demolitivo.

Al momento non esiste una terapia genetica radicale che possa portare alla reintroduzione, nelle cellule neoplastiche, di un gene difettoso reso funzionale. E’ molto interessante porre all’attenzione di chirurghi e clinici, quanto viene attualmente effettuato sul campo delle ricerche di ordine biologico.

In tempo non troppo lontano sia l’endoscopia diagnostica che quella operativa e la chirurgia maggiore verranno sempre piu’ guidate da presupposti di tipo genetico e biologico - molecolare la cui conoscenza non puo’ essere trascurata.

VII. Bibliografia

1. Arango D, Corner G, Wadler S, Catalano PJ, Augenlicht LH (2001). c-myc/p53 interaction determines sensitivity of human colon carcinoma cells to 5-fluorouracil *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* **61**: 4910-4915.
2. Zhao HY, Ooyama A, et al. Dawn regulation of c-myc and induction of an angiogenesis inhibitor, thrombospondin-1, by 5-FU in human colon cancer KM12C cells. *Cancer Lett.* (2008) **270(1)**: 156-63.
3. Leung N, Turbide C, et al. Intestinal tumor progression in promoted by decreased apoptosis and dysregulated Wnt signaling in Ceacam1^{-/-} mice. *Oncogene* (2008) **27(36)**: 4943-53.
4. Yekkala K, Baudino TA. Inhibition of intestinal polyposis with reduced angiogenesis in ApcMin/+ mice due to decreases in c-myc expression. *Mol. Cancer Res.* (2007) **5(12)**: 1296-303.
5. Augenlicht LH, Wadler S, Corner G, Richards C, Ryan L, Multani A, Pathak S, Benson A, Haller D, Heerdt BG (1997). Low-level c-myc amplification in human colonic carcinoma cell lines and

tumors: a frequent, p53-independent mutation associated with improved outcome in a randomized multi-institutional trial. *Cancer Res* **57**: 1769-1775.

6. Dang CV (1999). c-myc target genes involved in cell growth, apoptosis and metabolism. *Mol Cell Biol* **19**: 1-11.

7. Mariadason JM, Arango D, Shi Q, Wilson AJ, Corner G, Nicholas C, Aranes MJ, Schwartz EL, Lesser M (2003). Gene expression profiling based prediction of response of colon carcinomas cells to chemotherapeutic agents. *Cancer Res (in Press)*.

8. Mitchell KO, El - Deiry WS (1999). Overexpression of c-myc inhibits p21 WAF1/CIP1 expression and induces S-phase entry in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-sensitive human cancer cells. *Cell Growth Differ* **10**: 223-230.

9. Prendergast GC (1999). Mechanisms of apoptosis by c-myc. *Oncogene* **18**: 2967-2987.

10. Zindy F, Eischen CM, Randle D, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, Roussel MF (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* **12**: 2424-2433.

11. Eaden J, et al. Colorectal cancer prevention in ulcerative colitis: a case - control study. *Aliment. Pharmacol. ther.* (2000) **14**: 145-153.
12. Cheng Y, et al. 5-Aminosalicylic acid is an attractive candidate agent for chemoprevention of colon cancer in patients with inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* (2005) **11**: 309-314.
13. Gascher C, et al. Mesalazine improves replication fidelity in cultured colorectal cells. *Cancer Res.* (2005) **65**: 3993-3997.
14. Gascher C. Review article: the chemoprevention of colorectal carcinoma. *Aliment. Pharmacol. Ther.* (2004) **20(suppl. 4)**: 31-35.
15. Reinacher-Schick A, et al. Mesalazine causes a mitotic arrest and induces caspase-dependent apoptosis in colon carcinoma cells. *Carcinogenesis* (2003). **24**: 443-451.
16. Shinada T, et al. Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. *Gut* (2002) **50**: 658-664.
17. Chu EC, et al. Mesalazine downregulates c-myc in human colon cancer cells. A key to its chemopreventive action? *Aliment. Pharmacol. Ther.* (2007) **25**: 1443-1449.

18. Patel L, et al. Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma are mediated via upregulation of PTEN. *Curr. Biol.* (2001) **11**: 764-768.
19. Shen D, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists inhibit the proliferation and invasion of human colon cancer cells. *Postgrad. Med. J.* (2007) **83**: 414-419.
20. Teresi RE, et al. Increased PTEN expression due to transcriptional activation of PPARgamma by Lovastatin and Rosiglitazone. *Int. J. Cancer* (2006) **118**: 2390-2398.
21. Aaltonene LA, Salovaara R, Kristo P, et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N. Eng. J. Med.* (1998) **338**: 1481.
22. Adjei AA, Erlichman C, Davis J et al. A phase I trial of the farnesyl transferase inhibitor SCH66336: evidence for biologic and clinical activity. *Cancer Res* (2000) **6**: 1871.
23. Allen JI. Colorectal cancer, *Molecular Biology in Cancer Medicine. London (UK), Dunitz* (1999).
24. Azumaya M, Kobayashi M, Ajioka Y, et al. Size-dependent expression of cyclooxygenase-2 in sporadic colorectal adenomas

relative to adenomas in patient with familiar adenomatous polyposis. *Pathol Int.* (2002) **52**: 282.

25. Bergsland E, Hurwitz H, fehrenbacher L, et al. A randomized phase II trial comparing rhuMab VEGF (recombinant humanized Monoclonal antibody to Vascular Endothelial cell Growth factor) plus 5 FluorUracil/LeucoVorin (FU/LV) alone in patients with metastatic colorectal cancer (abstract). *A Soc. Cin. Oncol.* (2000) **19**: 242.

26. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familiar predisposition: Development of International criteria for the determination Microsatellite Instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* (1998) **15**: 5248.

27. Chen YQ, Hsieh JT, Yau F, et al. Induction of apoptosis and G2/M cell cycle rest by DCC. *Oncogene* (1999) **29**: 247.

28. Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin. cancer Res.* (2001) **7**: 2958.

29. Ellis LM, Takahashi Y, Liu W, et al. Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: Biology and therapeutic implications. *Oncologist* (2000) **1**: 11.
30. Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF, et al. The ABC of APC. *Hum Mol. Gen.* (2001) **10**: 721.
31. 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.
32. Gille H, Kowalski J, Li B, et al. Analysis of biologic effects and signaling properties of Flt.1 (VEGFR) and KDR (VEGFR-2): a reassessment using novel receptro-specific vascular endothelial grwth factor mutants. *J. Biol. Chem.* (2001) **276**: 3222.
33. Gnanasampanthan G, Elsaleh, McCaul K, et al. K-ras mutation type and survival benefit from adjuvant chemotherapy in Dukes' colorectal cancer. *J. Pathol.* (2001) **195**: 543.
34. Guldenschuh I, Hurlimann R, Muller A, et al. Relationship between APC denotype, polyp distribution, and oral sulindac treatment in the colon and rectum of patient with familiar adenomatous polyposis. *Dis. Colon Rectum* (2001) **44**: 1090

35. Magne N, Fischell JL, Dubreil A, et al. Influence of epidermal growth factor receptor (EGFR), p53 and intrinsic MAP kinase pathway status of tumor cells on the antiproliferative effect of ZD1839 ("Iressa"). *Br J. Cancer* (2002) **86**: 1518.

36. Midiri G, Tesoriere A, Giarneri E, et al. Fattori genetici e cancro del colon-retto: una nuova frontiera pre la sperimentazione clinica. *Giorn. Chir.* (1999) **20**: 373.

37. Midiri G, Consorti F, Giarnieri E, et al. In Advances in molecular genetics and clinical implications of sporadic colorectal cancer. In Advances in abdominal surgery. *Kluwer Ac Pub. Dordrecht The Netherlands.* (2002)

38. Hao XP, Frayling IM, Sgouros JG, et al. The spectrum of p53 mutation in colorectal adenomas differs from that in colorectal carcinomas. *Gut* (2002) **50**: 834.

39. Zujewski J, Horak ID, Bol CJ, et al. Phase I and pharmacokinetic study of farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in advanced cancer. *J. Clin. Oncol.* (2000) **18**: 927.

40. Arango D, Mariadason JM, Wilson AJ, et al. c-myc overexpression sensitises colon cancer cells to camptothecin-induced apoptosis. *British J. of Cancer* (2003) **89**: 1757-1765.