

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FOGGIA**



**Facoltà di Medicina e Chirurgia**

---

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
ONCOLOGIA SPERIMENTALE**

**Ciclo XX**

**Dalla discovery del “Cancer Methylome” alla validazione  
di nuovi biomarkers epigenetici nelle neoplasie  
gastrointestinali.**

Dottoranda:

**Maria Luana Poeta**

Coordinatore del corso:

**Chiar. mo Prof. Francesco Paolo CANTATORE**

Relatore:

**Chiar. mo Prof. Vito Michele FAZIO**

Correlatore:

**Chiar. mo Prof. Matteo LANDRISCINA**

---

*Anno Accademico 2013-2014*

## Sommario

1. INTRODUZIONE.....	4
1.1 Epidemiologia dei tumori Colon-rettali e del Pancreas: .....	4
1.2 Valutazioni patologiche e “clinical needs” nel tumore del Colon – Retto e del Pancreas .....	6
1.2.1 Stadiazione Clinica dei tumori colon-rettali e del pancreas .....	7
1.2.2 Stadiazione Patologica dei tumori colon-rettali e del pancreas .....	9
1.2.3 Dalla Stadiazione al Management Terapeutico .....	30
1.3 Dal Trattamento al Follow-up.....	38
1.4 Biomarcatori in Oncologia.....	40
1.4.1 Definizione di Biomarcatore.....	41
1.4.2 Marcatori Biologici Aspecifici.....	44
1.5 Dal Modello Classico di cancerogenesi genetica alla identificazione di marcatori di mutazione .....	47
1.5.1 Marcatori Genetici.....	51
1.6 Dal Modello Integrato di Cancerogenesi Epigenetica Staminalle all’identificazione di Nuovi Marcatori Tumore-Specifici .....	55
1.6.1 Marcatori Epigenetici.....	59
2. OBIETTIVO DELLA TESI.....	70
3. MATERIALI E METODI.....	70
3.1 Arruolamento dei Pazienti e Raccolta dei Campioni.....	70
3.2. Estrazione del DNA .....	71
3.3. Trattamento con Sodio Bisolfito.....	72
3.4. Analisi di metilazione con QMSP (PCR quantitativa metilazione-specifica).....	75
3.5 Selezione di $\beta$ 4-GALT1 e KIF1A.....	77
3.6 Analisi Statistica .....	78
4. RISULTATI.....	78
4.1 Discovery del “Cancer Methylome” .....	78
4.2 Correlazione tra lo stato di metilazione di $\beta$ 4GalT1 e i livelli di mRNA e Proteina nelle neoplasie colon-rettali:.....	84
4.3 Analisi di metilazione dei geni KIF1A nell’adenocarcinoma pancreatico.....	85
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	87
6. BIBLIOGRAFIA .....	88

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Epidemiologia dei tumori Colon-rettali e del Pancreas:

### Neoplasie del colon-retto

Il carcinoma del grosso intestino è una delle principali cause di morbidità e mortalità per tumore, in tutti i Paesi occidentali. I tumori del Colon-Retto rappresentano il terzo tumore più frequente nei Paesi Occidentali. Gli ultimi dati statistici rilevano che l'incidenza e la mortalità stimate per le neoplasie colon-rettali per 2013 negli Stati Uniti sono rispettivamente di 142.820 nuovi casi e 50.830 decessi (1). In Europa, è il tumore più frequente nei non fumatori dei due sessi combinati. In Italia, l'incidenza stimata è di 40-45.000 nuovi casi l'anno; muoiono a causa della malattia circa 20.000 persone ogni anno. I tassi di incidenza e mortalità più elevati si registrano nell'Italia centro-settentrionale, quelli più bassi nel meridione e nelle Isole. Negli ultimi decenni in Italia, come in gran parte dell'Europa, gli andamenti temporali di mortalità sono stati favorevoli, con una diminuzione di oltre il 20% negli ultimi 15 anni. Questi andamenti favorevoli sono stati più precoci nelle donne ed il rapporto di mortalità tra i due sessi (M/F) per il tumore dell'intestino è cresciuto da 1.2 negli anni '50 fino ad arrivare a 1.5 (1-3) (2). I tumori del grosso intestino presentano almeno tre caratteristiche di interesse:

- alcuni fattori di rischio ambientali noti;
- lesioni precancerose - gli adenomi - che sono i precursori biologici della maggior parte dei carcinomi;
- una base genetica, almeno in una parte di questi tumori.

Al pari delle altre neoplasie solide la dimensione del tumore alla diagnosi e la presenza di metastasi linfonodali sono fondamentali fattori prognostici che determinano la sopravvivenza e permettono di pianificare le scelte terapeutiche. Negli ultimi 15 anni si è dimostrato che il tumore del colon-retto è una malattia progressiva, che attraverso un processo multifasico progredisce da una lesione relativamente benigna ad una lesione aggressiva. Numerosi studi epidemiologici hanno dimostrato come la sua insorgenza possa essere favorita da fattori ambientali.

Circa il 98% di tutte le neoplasie maligne del Colon – Retto sono adenocarcinomi.

Il tumore del Colon – Retto ha il suo picco di incidenza tra i 60 e i 70 anni, l'insorgenza di tumore in età più precoce deve sempre fare pensare ad una sindrome poliposica ereditaria o ad una forma di tumore familiare non poliposico. Circa il 22% dei carcinomi è localizzato nel cieco e nel colon ascendente, l'11% nel Colon traverso, il 6% nel colon discendente, il 55% nel retto-sigma ed il rimanente 6% si localizza in sede multipla (3).

Nonostante tutti i tumori colici possano iniziare come forme in situ all'interno di polipi adenomatosi, essi evolvono in diversi quadri morfologici: nel colon prossimale è più frequente una crescita polipoide, mentre nel colon distale tendono ad avere una crescita stenotomica con aree ulcerate. Con il passare del tempo ambedue le forme di tumore infiltrano la parete dando metastasi linfonodali e sistemiche.

I carcinomi del Colon – Retto rimangono asintomatici per anni. I sintomi si sviluppano in modo insidioso e spesso sono presenti da mesi o da anni prima della diagnosi. Per quanto riguarda il colon destro il paziente mostra all'esordio astenia, malessere, anemia sideropenica, i carcinomi che insorgono sul colon sinistro sono caratterizzati da una sintomatologia più precoce determinata da alterazioni dell'alvo. I tumori del colon destro proprio a causa di una diagnosi che il più delle volte è tardiva rispetto al colon sinistro hanno una prognosi peggiore.

### **Neoplasie del Pancreas:**

Il carcinoma pancreatico presenta un basso tasso di incidenza in quasi tutte le popolazioni. Questa patologia sarebbe di scarso interesse se il tasso di mortalità non fosse così elevato. Infatti le stime di incidenza e mortalità negli USA relative all'anno 2013 sono rispettivamente di 45.220 e 38.460 (1).

Inoltre, poiché il tasso di mortalità si avvicina a quello di incidenza, il cancro pancreatico rappresenta la quarta causa più comune di morte per tumore, nella maggior parte dei Paesi occidentalizzati. La maggior parte dei pazienti affetti da questa patologia muore a causa della malattia. Grazie alla chirurgia, circa il 20% dei pazienti sopravvive a 5 anni, ma solo il 20% dei pazienti può essere sottoposto alla resezione del pancreas. Nei Paesi occidentali, l'età media dei pazienti alla diagnosi è di circa 70 anni e, come per quasi tutti gli altri tumori diagnosticati in età adulta, i tassi di incidenza e

mortalità sono fortemente in relazione all'età. Solo circa il 5-10% dei pazienti sviluppa il cancro al pancreas prima dei 50 anni. Questo gruppo potrebbe però comprendere pazienti affetti da un disturbo genetico congenito. La probabilità cumulativa di sviluppare un tumore del pancreas nell'arco della vita è di circa l'1% negli uomini ed un po' più bassa nelle donne. Sembra ci sia correlazione minima, se non nessuna, con fattori di rischio ormonali legati al sesso (4), mentre il fumo è il principale fattore responsabile per gli elevati tassi osservati nella popolazione maschile. Sono state riscontrate notevoli differenze razziali nella frequenza di cancro del pancreas, con percentuali sensibilmente superiori nei neri rispetto ai caucasici, mentre le percentuali più basse sono state registrate in alcune popolazioni asiatiche. I motivi non sono chiari: le differenze nel numero di fumatori non spiegano l'elevato tasso di tumore pancreatico nei neri, tuttavia ci potrebbero essere differenze genetiche in relazione alla razza nel processo di detossificazione delle sostanze carcinogeniche prodotte dal tabacco. Un altro fattore importante potrebbe essere l'elevata prevalenza di insufficienza di vitamina D nella popolazione nera (5).

La distribuzione su scala mondiale del cancro pancreatico mostra una curiosa distribuzione geografica, con tassi più alti osservati man mano che ci si allontana dall'equatore (6). Ciò potrebbe essere correlato ai bassi livelli di vitamina D, fortemente legato all'esposizione alla luce del sole e ai raggi ultravioletti (7,8). I tassi di mortalità in Italia sono intermedi rispetto agli altri Paesi europei con la presenza di variazioni tra Nord e Sud, più elevati nell'Italia settentrionale, intermedi nell'Italia centrale e bassi nell'ambito dell'Italia meridionale.

## **1.2 Valutazioni patologiche e “clinical needs” nel tumore del Colon – Retto e del Pancreas**

La stadiazione nel tumore del Colon-Retto e del Pancreas riveste una notevole importanza poiché guida le scelte terapeutiche ed è predittiva per la prognosi.

Per le metodiche di stadiazione viene oggi seguita la settima edizione del Cancer staging Manual dell'AJCC, secondo il sistema del TNM (Tumor Node Metastases) (9).

### ***1.2.1 Stadiazione Clinica dei tumori colon-rettali e del pancreas***

**Neoplasie Colon-rettali:** La necessità di una valutazione del tumore prima dell'intervento chirurgico è importante al fine di cercare di raggiungere quanto più possibile la radicalità, per quanto riguarda il colon ed il retto, o per ipotizzare l'uso di chemio/radio-terapia neoadiuvante per ridurre la dimensione tumorale rendendola aggredibile chirurgicamente soprattutto nella terapia del tumore del retto (10).

Ad oggi l'unica terapia che permette di raggiungere la *guarigione* per l'adenocarcinoma del Colon – Retto è la chirurgia radicale. Nonostante una corretta stadiazione tumorale si ottenga esclusivamente con la valutazione istologica, la stadiazione clinica è necessaria.

I mezzi di cui disponiamo per poter valutare il Colon e provvedere ad una stadiazione clinica sono: la colonscopia, l'ecoendoscopia, la valutazione istologica di un campione di tessuto tumorale, l'emocromo, il CEA ed il controllo radiologico mediante tomografia computerizzata (TC).

La colonscopia permette di eseguire prelievi biotipici multipli riuscendo ad ottenere un'analisi istologica della massa neoplastica. I polipi si considerano maligni quando presentano una componente cellulare neoplastica che oltrepassa la muscolaris mucosae (pT1); si considerano invece carcinomi in situ quando la componente neoplastica è confinata alla muscolaris mucosae (pTis). I carcinomi in situ poiché non arrivano nella regione vascolo-linfatica non hanno capacità metastatica. Per i pazienti che presentano invece un carcinoma del Colon invasivo è necessario un accurato controllo diagnostico. Una nuova tecnica che si sta rivelando molto utile sia in quanto economica ma anche perchè è al tempo stesso molto accurata per la valutazione della massa tumorale e del coinvolgimento linfonodale è l'ecoendoscopia. Nel Colon tuttavia, soprattutto nella porzione prossimale, l'utilizzo dell'ecoendoscopia è ancora molto limitato a causa delle difficoltà tecniche ad essa connesse (11).

La TC viene eseguita sul torace, sull'addome e sulla pelvi per escludere la presenza di metastasi a distanza. I limiti della TC sono connessi al fatto che essa non riesce ad identificare lesioni di diametro inferiore ad 1 cm. La tomografia ad emissione di positroni (PET) non è indicata di routine in assenza di malattia metastatica sincrona.

A causa della situazione anatomica del colon, la stadiazione clinica non fornisce tuttavia dati estremamente precisi a differenza del retto. La stadiazione patologica diviene necessaria per stabilire il trattamento farmacologico e determinare la prognosi. Per quanto riguarda il tumore del Retto la stadiazione clinica è molto più accurata grazie alla localizzazione dell'organo ed alla possibilità di più tecniche d'analisi: oltre alle metodiche diagnostiche che si utilizzano nella stadiazione clinica del tumore del Colon, nel Retto è possibile utilizzare in maniera molto più specifica l'ecoendoscopia e la Risonanza Magnetica Nucleare (RMN).

È necessaria un'attenta valutazione sulle caratteristiche patologiche del prelievo biptico: un polipo rettale è definito maligno quando le cellule cancerose superano la muscolaris mucosae e invadono la sottomucosa (pT1). I polipi che presentano cellule cancerose che non superano la muscolaris mucosae vengono classificati come carcinomi in situ (pTis). La stadiazione clinica riveste nel tumore del Retto un'importanza eccezionale in quanto permette di pianificare il management terapeutico successivo grazie alle informazioni preoperative sullo stadio della malattia. Lo stadio clinico è in grado di guidare la scelta dell'intervento terapeutico (12).

Lo staging clinico completo prevede una colonscopia totale per determinare la localizzazione del tumore e la presenza di eventuali lesioni sincrone o altre condizioni patologiche. È necessario inoltre un esame fisico completo che valuti il performance status per determinare il rischio operatorio, il dosaggio del CEA, TC del torace-addome e pelvi. La regione del retto può essere attentamente studiata mediante ecoendoscopia ad ultrasuoni e risonanza magnetica con una maggiore accuratezza diagnostica nell'identificazione della profondità dell'invasione tumorale e nell'identificazione di metastasi linfonodali (13). La RM non è tuttavia in grado di identificare micrometastasi. L'utilizzo della PET è ancora gravato dai costi estremamente elevati e dalla disponibilità bassa di strumentazione, essa viene oggi suggerita prevalentemente per il follow-up e per la diagnosi di metastasi a distanza anche se non ci sono indicazioni validate a riguardo.

La stadiazione clinica si basa inoltre sull'esame biptico e sull'analisi istologica del campione prelevato. Lo studio istologico deve valutare la presenza di invasione della muscolaris mucosae.

**Neoplasie del Pancreas:** Gli esami strumentali per accertare l'eventuale presenza di un tumore pancreatico possono comprendere: l' *ecografia* per individuare la presenza di masse di consistenza diversa rispetto ai tessuti sani; la *tomografia computerizzata (TC)*, la *risonanza magnetica nucleare (RMN)* se esiste il dubbio che il tumore abbia invaso le vene e le arterie intorno al pancreas, oppure l' *angiografia*, che studia il flusso del sangue nei vasi arteriosi vicino alla ghiandola; la *colangiopancreatografia endoscopica retrograda (ERCP)*, una tecnica che prevede l'introduzione di una sottile sonda attraverso le cavità orale fino a raggiungere lo stomaco, il dotto pancreatico e le vie biliari che vengono visualizzate mediante mezzo di contrasto. Durante l'ERCP l'operatore può inoltre eseguire una *biopsia* introducendo nel pancreas un ago sottile o una piccolo brush per prelevare un campione di cellule che potranno essere caratterizzate all'esame al microscopio. Durante quest'esame si può inoltre effettuare un'*ecografia endoscopica (EUS)* per poter meglio visualizzare l'estensione della malattia nei tessuti circostanti. E' inoltre possibile effettuare un *ago-aspirato* o *ago-biopsia* (a seconda della quantità di tessuto prelevato) nel corso di una tomografia computerizzata oppure di un'ecografia, allo scopo di prelevare un campione di cellule da inviare in laboratorio per accertare l'eventuale presenza di cellule tumorali.

Le probabilità di guarigione (*prognosi*) e la scelta del trattamento dipendono dalla localizzazione e dallo stadio del tumore (se è circoscritto all'esofago o se si è diffuso ad altri organi), nonché dalle condizioni generali di salute (12).

### ***1.2.2 Stadiazione Patologica dei tumori colon-rettali e del pancreas***

#### **Neoplasie Colon-rettali:**

**Caratteristiche macroscopiche.** La maggioranza dei carcinomi del grosso intestino sono localizzati nel sigma (45% circa) e nel retto (25%). Nelle ultime decadi è stato descritto un incremento dei tumori localizzati nel colon prossimale (cieco, colon ascendente e trasverso), che attualmente costituiscono oltre il 30% dei casi. Le dimensioni variano da pochi mm a più di 10 cm di diametro. L'aspetto macroscopico può essere esofitico/vegetante con crescita prevalentemente intraluminale, più frequente nel colon destro, endofitico/ulcerato con prevalente crescita intramurale,



anulare con interessamento circonfferenziale della parete e stenosi del lume, a placca, o diffusamente infiltrante tipo linite plastica. Aspetti misti o intermedi sono frequenti. Le lesioni precoci presentano spesso conformazione polipoide, pedunculata o sessile (3).

**Classificazione istologica degli adenomi.** Gli adenomi coloretali vengono classificati in base all'istotipo ed al grado di displasia. Secondo la classificazione istologica WHO (15), si distinguono tre tipi di adenoma: tubulare (componente tubulare > 80%), villosa (componente villosa > 80%) e tubulo-villosa (entrambe le componenti presenti in misura compresa tra 20% e 80%). La displasia viene graduata in basso grado (lieve o moderata) ed alto grado (grave), in base all'entità delle alterazioni architetturali (conformazione delle ghiandole e dei villi) e citologiche (muco secrezione; stratificazione, polarità, ipercromasia e polimorfismo nucleari; attività mitotica).

#### **Caratteristiche istologiche dei carcinomi**

**Istotipo:** La classificazione WHO (15) distingue i seguenti istotipi:

- adenocarcinoma, costituito da strutture ghiandolari di variabili dimensioni e configurazione;
- adenocarcinoma mucoso (o mucinoso), caratterizzato dalla presenza di abbondante muco extracellulare, che costituisce > 50% del volume tumorale;
- carcinoma a cellule con castone (signet-ring cell carcinoma), costituito per > 50% da cellule castonate, contraddistinte da un voluminoso vacuolo intracitoplasmatico di muco dislocante alla periferia il nucleo;
- carcinoma midollare, prevalentemente costituito da lamine e trabecole solide di cellule in genere regolari e con modeste atipie nucleari e caratterizzato dalla presenza di numerosi linfociti intraepiteliali;
- carcinoma indifferenziato, privo di aspetti morfologici di differenziazione;
- carcinoma a piccole cellule, con caratteristiche morfologiche e biologiche simili a quelle del carcinoma polmonare a piccole cellule;
- carcinoma-adenosquamoso;
- carcinoma-squamoso.

Gli adenocarcinomi rappresentano oltre l'85% dei casi, gli adenocarcinomi mucoidi il 10% e gli altri istotipi nel complesso meno del 5%, essendo i carcinomi squamosi ed

adenosquamosi molto rari. I tumori con una componente mucoide < 50% sono classificati come adenocarcinomi. I carcinomi a cellule con castone e a piccole cellule sono associati ad una prognosi peggiore, mentre il carcinoma midollare, essendo quasi sempre MSI-H, comporta una prognosi favorevole. La prognosi dell'adenocarcinoma mucoide, MSI-H nel 30% dei casi, sembra principalmente dipendere dalle caratteristiche genetiche della neoplasia. Nel complesso, la valutazione dell'istotipo è più rilevante ai fini della caratterizzazione bio-patologica del tumore, che della definizione della prognosi del paziente.

**Grado di differenziazione:** in base alle caratteristiche delle ghiandole, utilizzando i criteri della classificazione WHO, gli adenocarcinomi sono suddivisi in ben e moderatamente differenziati (basso grado, con ghiandole regolari o modicamente irregolari) e poco differenziati (alto grado, con ghiandole irregolari od assenti). In presenza di eterogeneità intratumorale, il grado viene definito dalla componente meno differenziata, con l'esclusione dei margini di infiltrazione, ove sono spesso presenti aspetti di sdifferenziazione. La suddivisione in due categorie è più riproducibile rispetto a quella in tre gradi e quindi preferibile, anche in ragione del fatto che dal punto di vista clinico è rilevante l'identificazione dei tumori poco differenziati a prognosi peggiore. Recentemente, il College of American Pathologists ha proposto un sistema di grading in due classi, basato su criteri classificativi differenti (basso grado: > 50% del tumore produce ghiandole; alto grado: < 50% del tumore produce ghiandole) (16). Un analogo sistema di grading basato sulla predominanza della componente bene/moderatamente differenziata o scarsamente differenziata è utilizzato dai patologi anglosassoni (17). Negli adenocarcinomi mucoidi, il grado di differenziazione viene determinato basandosi sulle caratteristiche sia della componente non mucoide sia di quella mucoide (basso grado: accumuli di muco delimitati da epitelio colonnare mucosecernente; alto grado: aggregati irregolari, o singole cellule immerse nel muco o presenza di cellule con castone).

**Altri parametri:** numerose altre caratteristiche istologiche vengono prese in considerazione nel carcinoma coloretale, soprattutto in funzione di una correlazione con il decorso clinico. Tra queste, ricordiamo l'invasione vascolare e perineurale, il tipo di crescita (espansiva od infiltrativa), il grado di infiltrazione linfocitaria al margine di invasione, la presenza di aggregati nodulari linfocitari peritumorali

(reazione linfocitaria "tipo Crohn"), il numero di linfociti compenetranti le cellule neoplastiche (Tumor-Infiltrating Lymphocytes, TIL) ed il tumor budding.

**Correlazioni morfo-genotipiche:** i carcinomi coloretali MSI-H presentano caratteristiche patologiche distintive rispetto ai carcinomi non MSI-H: prevalente localizzazione nel colon prossimale, scarsa differenziazione, più frequente istotipo mucoide, midollare o indifferenziato, marcata infiltrazione linfocitaria peritumorale "tipo Crohn" e presenza di un elevato numero di TIL (18). Tuttavia, ad eccezione dell'istotipo midollare (19), non esistono alterazioni istopatologiche patognomoniche del fenotipo MSI-H, per la cui identificazione si rendono pertanto necessarie appropriate indagini genetiche (analisi dell'instabilità dei microsatteliti con PCR) od immunoistochimiche (analisi dell'espressione delle proteine del MMR) (20).

**Caratteristiche Genetico-molecolari.** Dal punto di vista genetico-molecolare si distinguono due principali categorie di carcinoma colrettale (18, 21). La prima e più frequente è caratterizzata da instabilità cromosomica, con marcate alterazioni del cariotipo, frequenti delezioni alleliche, aneuploidia ed inattivazione dei geni onco-soppressori *APC* e *p53* e di geni localizzati sul braccio lungo del cromosoma 18. Questi tumori progrediscono secondo la sequenza adenoma-carcinoma, prendendo origine dai comuni adenomi. L'evento iniziante è rappresentato dall'inattivazione biallelica del gene *APC* cui segue il progressivo accumularsi delle altre alterazioni genetiche (in ordine preferenziale: mutazione di *K-ras*, delezione di 18q, inattivazione di *p53*).

La seconda categoria (15% dei casi) è caratterizzata da instabilità dei microsatteliti (MSI) e comprende tumori sporadici (prevalenti) ed ereditari (sindrome di Lynch). I carcinomi con MSI (o più precisamente MSI-H) presentano modeste alterazioni del cariotipo, contenuto nucleare di DNA diploide, infrequenti delezioni alleliche ed alterazioni del gene *p53* e tendono, per contro, ad accumulare mutazioni in brevi sequenze ripetute presenti nella porzione codificante di numerosi geni, quali *TGFβRII*, *BAX* e *IGFR1I*. Il carcinoma MSI-H è determinato da deficit del sistema di riparazione del DNA, DNA Mismatch Repair (MMR), causato da metilazione biallelica del promoter del gene *MLH1* nei carcinomi sporadici e da mutazione germline di *MLH1*, *MSH2* o, più raramente, di *MSH6* e *PMS2*, con inattivazione somatica del secondo allele, nei tumori ereditari (22, 23). Mentre la sequenza

adenoma-carcinoma è operante anche nella genesi dei tumori MSI-H ereditari, nei quali la progressione da adenoma a carcinoma si verifica più rapidamente, i carcinomi MSI-H sporadici sembrano originare da precursori morfologici differenti (polipi iperplastici ed adenomi serrati, costituenti la serrated neoplasia pathway) (24, 25). Negli ultimi anni, è stata dimostrata l'esistenza di una terza categoria molecolare di carcinoma coloretale, caratterizzata da elevati livelli di metilazione genica (CpG Island Methylator Phenotype, CIMP) (26, 27). Questi tumori presentano metilazione del promoter di numerosi geni, tra cui geni onco-soppressori e mutazione dell'oncogene *BRAF*. Inoltre, parte dei casi sono MSI-H per metilazione del promoter di *MLH1*. La maggioranza dei carcinomi CIMP si svilupperebbe da polipi serrati, secondo una sequenza polipo iperplastico → adenoma serrato → adenocarcinoma nella quale, a livello molecolare, la mutazione di *BRAF* è l'evento più precoce, cui segue la progressiva acquisizione del fenotipo CIMP e più tardivamente, in una parte dei casi, l'instaurarsi dell'instabilità dei microsatelliti.

**Stadiazione TNM.** Lo stadio è il più importante fattore prognostico nel carcinoma coloretale ed il principale parametro utilizzato per stabilirne il trattamento. Si raccomanda l'utilizzo del sistema di classificazione UICC-TNM (28).

**pT:** tumore primitivo

**pTis:** carcinoma in situ: intraepiteliale o con invasione della lamina propria della mucosa

**pT1:** tumore che infiltra la sottomucosa

**pT2:** tumore che infiltra la tonaca muscolare

**pT3:** tumore che infiltra a tutto spessore la tonaca muscolare con invasione della sottosierosa o dei tessuti pericolici o perirettali non rivestiti da sierosa

**pT4:** tumore che infiltra direttamente altri organi o strutture e/o il peritoneo viscerale

Dal punto di vista patologico, sarebbe più corretto utilizzare il termine di adenocarcinoma in situ per le neoplasie intraepiteliali (che non superano la membrana basale) e di adenocarcinoma intramucoso quando è presente infiltrazione della lamina propria (senza estensione oltre la muscularis mucosae). Nel colon-retto, comunque, entrambi i tipi di neoplasia sono privi di potenziale metastatico e per tale motivo, molti patologi ritengono preferibile utilizzare per queste lesioni il termine di displasia grave (alto grado). Il carcinoma infiltrante la sottomucosa (pT1) rappresenta la forma

più precoce di adenocarcinoma con potenziale metastatico (carcinoma coloretale iniziale o early colorectal cancer). Spesso presenta conformazione polipoide, è associato ad una componente adenomatosa, da cui origina e viene asportato endoscopicamente (cosiddetto adenoma o polipo cancerizzato o maligno) (29). In caso di rimozione endoscopica, la valutazione istologica della lesione ha un'importanza primaria nel definire il successivo trattamento. L'infiltrazione del margine di resezione, l'invasione di vasi linfatici o venosi e la scarsa differenziazione tumorale costituiscono sicura indicazione alla resezione chirurgica. Quando questi tre parametri sono negativi, il rischio di presenza di metastasi linfonodali o di residui neoplastici nella parete è molto basso, giustificando un atteggiamento conservativo. Ulteriori fattori che nella maggior parte degli studi sono risultati correlarsi al rischio di metastasi linfonodali sono il budding tumorale e la misurazione microscopica quantitativa della massima profondità di infiltrazione nella sottomucosa (30).

<b>pN:</b>		linfonodi		regionali
<b>pN0:</b>	linfonodi	regionali	liberi	da metastasi
<b>pN1:</b>	metastasi	in	1-3	linfonodi regionali
<b>pN2:</b>	metastasi	in	4 o più	linfonodi regionali

Nelle neoplasie coloretali non è infrequente il riscontro nel tessuto adiposo periviscerale di noduli tumorali, senza evidenza istologica di residuo tessuto linfatico. Secondo l'ultima classificazione TNM, questi noduli tumorali devono essere considerati come metastasi linfonodali quando presentano forma e contorno regolare del linfonodo, indipendentemente dalle dimensioni. I noduli con margini irregolari devono essere invece considerati come espressione di infiltrazione neoplastica discontinua ed eventualmente, anche di invasione venosa e pertanto non conteggiati come metastasi linfonodali regionali. Questo criterio classificativo qualitativo introdotto nella sesta edizione non è stato accolto dai patologi anglosassoni, che preferiscono attenersi a quanto riportato nella quinta edizione TNM, in cui i noduli tumorali vengono classificati esclusivamente in base alle dimensioni ed equiparati a metastasi linfonodali solo se di diametro > 3 mm (31). L'esame istologico del materiale ottenuto con una linfoadenectomia regionale comprende abitualmente 12 o più linfonodi. Il numero di linfonodi esaminati è comunque molto variabile e dipende da numerosi fattori, tra i quali i più importanti

sono una variabilità anatomica individuale, l'estensione chirurgica della linfadenectomia, l'accuratezza della ricerca effettuata dal patologo e le stesse caratteristiche istologiche e biologiche del tumore (32). Nei pazienti sottoposti a radioterapia pre-operatoria si riscontra più frequentemente un minor numero di linfonodi nel pezzo operatorio. Si ritiene comunque, che il numero medio di linfonodi esaminati per paziente sia un buon indice di qualità della pratica clinica e questo numero, grazie alla notevole attenzione posta al problema, è aumentato negli ultimi anni. Anche se è opinione comune che debba essere esaminato un minimo di 12 linfonodi per una definizione accurata della classe pN0, studi recenti hanno, in realtà, dimostrato che non esiste un valore soglia del numero di linfonodi da esaminare per una stadiazione adeguata. È compito del patologo cercare ed esaminare con la massima diligenza tutti i linfonodi presenti nel pezzo operatorio e, nel referto istopatologico, deve sempre essere specificato sia il numero di linfonodi esaminati sia il numero di linfonodi metastatici (33). Studi di recente pubblicazione hanno evidenziato che il numero di linfonodi esaminati è un importante parametro prognostico sia nei pazienti pN0 sia nei pazienti con linfonodi positivi, essendo stato dimostrato che un numero minore di linfonodi esaminati si associa ad una minore sopravvivenza (34). Inoltre, è stato recentemente riportato come il rapporto tra numero di N+ e numero totale di N esaminati sia un fattore prognostico indipendente e più significativo delle categorie pN (35). Secondo una regola generale della classificazione TNM, i casi con sola presenza di cellule tumorali isolate (ITC) nei linfonodi regionali sono classificati come pN0. Le ITC sono singole cellule o piccoli gruppi di cellule la cui dimensione massima non supera 0.2 mm, generalmente evidenziabili con analisi immunoistochimica, ma che possono essere rilevate anche con la colorazione ematossilina-eosina. Lo stesso criterio classificativo è da applicarsi quando la presenza di cellule tumorali o loro componenti viene evidenziata con tecniche non morfologiche, quali analisi molecolari. Questi casi vengono classificati come segue:

**pN0 (i-):** con l'esame istologico non si osservano metastasi nei linfonodi regionali; negativa la ricerca di ITC mediante metodi morfologici.  
**pN0 (i+):** con l'esame istologico non si osservano metastasi nei linfonodi regionali; positiva la ricerca di ITC mediante metodi morfologici

**pN0 (mol-):** con l'esame istologico non si osservano metastasi nei linfonodi regionali; negativa la ricerca di ITC mediante metodi non morfologici

**pN0 (mol+):** con l'esame istologico non si osservano metastasi nei linfonodi regionali; positiva la ricerca di ITC mediante metodi non morfologici

Nel carcinoma coloretale il significato prognostico di ITC, rilevate con metodi morfologici o molecolari, non è chiaramente definito, i diversi studi avendo prodotto risultati contrastanti. I tumori con sole micrometastasi (metastasi di dimensioni comprese tra 0.2 e 2 mm) possono essere identificati con l'aggiunta della sigla "(mi)", ad esempio pN1(mi).

**pM:** presenza di metastasi a distanza

**pM0:** assenza di metastasi a distanza

**pM1:** presenza di metastasi a distanza

Nel caso la stadiazione sia solo clinica "p" viene omesso.

Nel caso di stadiazione con ecografia endocavitaria lo stadio T e lo stadio N devono essere preceduti dalla lettera "u".

**Raggruppamento in stadi**

**Stadio 0:** Tis N0 M0

**Stadio I:** T1-2 N0 M0

**Stadio IIA:** T3 N0 M0

**Stadio IIB:** T4 N0 M0

**Stadio IIIA:** T1-2 N1 M0

**Stadio IIIB:** T3-4 N1 M0

**Stadio IIIC:** ogni T N2 M0

**Stadio IV:** ogni T ogni N M1

Gli stadi I, II e III corrispondono rispettivamente agli stadi A, B e C della classificazione di Dukes. Nella sesta edizione della classificazione UICC-TNM, è stata introdotta negli stadi II e III una suddivisione in sottogruppi ad indicare categorie di pazienti con prognosi differente, rispettivamente peggiore per lo stadio IIB rispetto al IIA, per lo stadio IIIC rispetto al IIIB e per il IIIB rispetto al IIIA (36).

**Stadiazione dopo terapia neoadiuvante.** Per quanto riguarda il carcinoma rettale, quando la stadiazione patologica viene effettuata dopo radioterapia o

radiochemioterapia, le categorie pTNM devono essere precedute dalla lettera "y" (ad esempio ypT2) ed indicano l'estensione del tumore al momento della valutazione istopatologica. La risposta tumorale alla terapia neoadiuvante sembra essere un rilevante fattore prognostico (37), ma i risultati riportati in letteratura non sono univoci. Sono stati proposti diversi sistemi di valutazione istologica del grado di risposta alla terapia neoadiuvante (38).

**Margini di resezione.** È importante verificare lo stato dei margini di resezione (prossimale, distale e radiale), essendo la radicalità dell'intervento un importante fattore prognostico e criterio di pianificazione terapeutica. La classificazione TNM distingue le seguenti categorie:

<b>R0:</b>	assenza	di	residui	tumorali
<b>R1:</b>	residui		tumorali	microscopici
<b>R2:</b>	residui		tumorali	macroscopici

In particolare, nel carcinoma del retto è fondamentale la valutazione istologica del margine di resezione radiale (o profondo o circonferenziale), essendo il suo interessamento il più importante fattore predittivo di recidiva loco-regionale. Inoltre, una recente meta-analisi ha evidenziato che il coinvolgimento del margine radiale comporta un significativo aumento del rischio di recidiva locale, di disseminazione metastatica e di morte per neoplasia anche in pazienti trattati con terapia neoadiuvante e total mesorectal excision (39). Nelle neoplasie rettali la distanza minima del tumore dal margine di resezione radiale dovrebbe sempre essere riportata nel referto istologico.

### **Neoplasie del Pancreas Esocrino:**

Le neoplasie pancreatiche si distinguono in base alle loro caratteristiche morfologiche, fenotipiche e molecolari. Queste proprietà riflettono la tendenza alla differenziazione nella direzione di una o più delle tre linee di differenziazione, riscontrabili nel pancreas normale: duttale, acinare ed endocrina (40). La differenziazione di linea è l'elemento cruciale che determina sia le caratteristiche biologiche sia il comportamento clinico di una determinata neoplasia pancreatiche (41). Esiste tuttavia una notevole discrepanza tra la prevalenza del carcinoma duttale (90%) e del carcinoma acinare (1%) che riflette la percentuale di cellule acinari (80%) e duttali



(5-10%) presenti nel pancreas normale. Tale discrepanza trova oggi spiegazione con l'ipotesi di una derivazione comune da cellule staminali, che si localizzerebbero nel comparto "duttale" (42, 43).

### **Caratteristiche istologiche e molecolari**

**Carcinoma duttale:** Il carcinoma duttale del pancreas caratterizzato da un suo decorso silente e successivo comportamento esplosivo ed altamente letale. Circa il 10% dei carcinomi pancreatici si sviluppa in pazienti geneticamente predisposti (44) e può essere associato a diverse sindromi genetiche familiari (45). Il carcinoma duttale macroscopicamente, è di solito caratterizzato da una massa solida, a margini infiltrativi, di colorito biancastro e consistenza duro-ligneo. Più raramente, può presentare un aspetto disomogeneo e talora "cistico" per l'effetto di modificazioni regressive, di tipo necrotico-emorragico. Il carcinoma della testa pancreatico si associa di solito a stenosi del coledoco terminale e del dotto di Wirsung e, nelle fasi avanzate, può estendersi alla papilla di Vater ed infiltrare il duodeno. Il carcinoma del corpo e della coda tende invece ad invadere il retroperitoneo, lo stomaco, il colon, l'omento, la milza ed i surreni. Microscopicamente, il carcinoma del pancreas è caratterizzato dalla presenza di strutture simil-duttali disperse in una ricca matrice stromale desmoplastica (46). La componente ghiandolare ricalca, in misura variabile, i caratteri dell'epitelio colonnare dei dotti pancreatici, ma non possiede caratteri distintivi rispetto all'epitelio del sistema biliare o della papilla di Vater. Il grading della neoplasia, basato su criteri citoarchitettonici, prevede tre gradi (47): G1: Presenza di strutture tubulari ben differenziate; G2, strutture tubulari moderatamente differenziate; G3, strutture ghiandolari scarsamente differenziate. La reazione desmoplastica conferisce alla neoplasia una consistenza lignea ed in casi particolari un aspetto definito a "cicatrice". La desmoplasia induce una considerevole riduzione del letto vascolare, che costituisce uno dei segni utili per la diagnosi differenziale radiologica tra tessuto normale e carcinoma. Carattere questo che, nella pratica clinica, è reso meno evidente dalle concomitanti modificazioni fibrose che si instaurano nel parenchima pancreatico peritumorale (pancreatite cronica ostruttiva). I caratteri immunohistochimici più rilevanti ricalcano il fenotipo della cellula duttale, con la positività per CEA, CA19-9, DUPAN-2, per le citocheratine 7,8,18,19 e, solo raramente, per la citocheratina 20. In particolare, le cellule tumorali esprimono le

apomucine MUC1 e MUC5AC (48, 49). Inoltre è stata riportata la positività per diversi tipi di proteine S100, per la mesotelina, l'antigene staminale prostatico, la claudina 4 e 18 (50). Tra le anomalie molecolari quelle più note e caratteristiche del carcinoma duttale del pancreas (51) comprendono l'attivazione mutazionale dell'oncogene K-ras, prerequisito essenziale per lo sviluppo di questo carcinoma e presente già a partire dalle modificazioni iperplastiche (in cui è riscontrata nel 30% dei casi) e l'inattivazione dei geni tumorali soppressori p16<sup>INK4a</sup> in gran parte dei casi e di p53 e DPC4/SMAD4 in circa la metà dei casi.

**Precursori del carcinoma invasivo:** Poiché il carcinoma del pancreas indipendentemente dallo stadio di malattia in cui viene scoperto presenta spesso una prognosi sfavorevole il riconoscimento nella sua fase pre-invasiva è estremamente importante. Si riconoscono tre distinte lesioni non-invasive: la prima rappresenta un reperto microscopico e comprende tutta una serie di modificazioni comprese nella categoria delle neoplasie pancreatiche intraepiteliali a) PanIN, mentre le altre due sono lesioni macroscopicamente e radiologicamente visibili e sono rappresentate dalle b) neoplasie papillari mucinose intraduttali (IPMN) e dalle c) neoplasie cistiche mucinose (MCN) (52):

a) *Neoplasie pancreatiche intraepiteliali (Pancreatic Intraepithelial Neoplasms, PanIN):* neoplasie epiteliali dei dotti di piccole dimensioni, visibili solo microscopicamente, di diametro < 0.5 cm, caratterizzate da epitelio colonnare frequentemente mucosecerno, piatto o con proliferazioni micropapillari che presentano un ampio ventaglio di modificazioni morfologiche con diversi gradi di atipia citologica e di alterazioni architetturali. Le lesioni PanIN sono suddivise in: **PanIN-1A-B:** costituite da epitelio colonnare piatto o micropapillare con nucleo basale ed abbondante citoplasma produttore mucina, privo di evidente atipia. Precedentemente queste lesioni erano considerate modificazioni iperplastiche-metaplastiche dell'epitelio; **PanIN-2:** caratterizzata da una proliferazione epiteliale piatta o micropapillare con pseudostratificazione nucleare, atipia citologica di grado moderato; **PanIN-3:** caratterizzata da proliferazione frequentemente micropapillare, cribriforme, con necrosi intraluminale, atipia citologica di alto grado e con frequenti mitosi. Attualmente, solo le lesioni tipo PanIN-3 debbono essere riportate nel referto

patologico, poiché per le lesioni PanIN-1 e PanIN-2 non ci sono prove sufficientemente consolidate per considerarle lesioni che possano comportare un rischio significativo di ulteriore progressione. Infatti, lesioni tipo PanIN-1 sono presenti nel 40% dei pancreas di pazienti non portatori di carcinoma, mentre quelle di tipo PanIN-3 sono associate alla presenza di carcinoma invasivo nel 30-50% dei casi. Si ritiene quindi che lesioni di tipo PanIN-3 abbiano una significativa importanza clinica nella progressione verso il carcinoma invasivo; resta tuttavia difficile stabilirne l'esatta incidenza per l'impossibilità di identificarle clinicamente. Le prove del loro significato neoplastico risiedono nel fatto che la maggior parte delle anomalie, riscontrate nel carcinoma invasivo, sono presenti in tutte le lesioni di tipo PanIN, con una frequenza che riflette i diversi gradi di atipia: mutazioni di K-ras, anomalie della telomerasi ed iperespressione di p21 e mutazioni di p53, DPC4 nei gradi avanzati. Sebbene queste anomalie possano essere riscontrate anche nelle IPMN, le anomalie di p53 e DPC4 sono meno frequenti; per converso, la positività per MUC2, tipicamente presente in una sottopopolazione di IPMN, è sempre assente nelle PanIN (53). Le lesioni tipo PanIN presentano fenotipo "gastrico-foveolare", mentre le lesioni di tipo IPMN soprattutto di tipo intestinale.

***b) Neoplasie intraduttali papillari mucinose (Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms, IPMN):*** neoplasie mucinose frequentemente papillari, che si sviluppano nel dotto principale o nei dotti di secondo ordine sempre associate ad ectasia duttale macroscopicamente visibile e comunque > 1 cm (52). Le neoplasie IPMN sono suddivise in 3 sottotipi: 1 "centrali" o del dotto principale, con coinvolgimento del dotto di Wirsung; 2 "periferiche" o dei dotti collaterali, con coinvolgimento esclusivo dei dotti di secondo ordine; 3 "miste", con coinvolgimento di entrambi. Le IPMN di tipo centrale spesso si accompagnano a protrusione nel lume duodenale sia della papilla maggiore sia di quella minore, con secrezione di mucina (46). Le IPMN, descritte per la prima volta nel 1980, sono state per lungo tempo misconosciute, riportate sotto vari nomi o incluse tra i tumori cistici mucinosi. Nell'attuale pratica clinica rappresentano il 20-30% di tutte le neoplasie pancreatiche resecate. Presentano una modesta prevalenza per il sesso maschile; l'età media, riferita alla popolazione generale, in cui si manifestano è di 65 anni (con una

differenza di 5-8 anni tra le neoplasie a basso grado ed il carcinoma infiltrante). L'elemento distintivo è rappresentato dalla crescita intraduttale, con dilatazione diffusa o segmentaria del dotto principale e/o dei dotti di secondo ordine, in assenza di stenosi meccanica o tumorale. Si distinguono due varianti principali:

- 1) *variante prevalentemente papillare*, nella quale la mucosa che riveste i tratti interessati dalla neoplasia presenta vegetazioni intraluminari di tipo villosi. Tali proliferazioni, che si presentano all'ERCP (Colangiopancreatografia Endoscopica Retrograda) come difetti di riempimento ed alla TC (Tomografia Computerizzata) e RM (Risonanza Magnetica) come vegetazioni endoluminali adese alla parete, costituiscono un prezioso elemento diagnostico differenziale nei riguardi sia della pancreatite cronica sia della dilatazione secondaria del sistema duttale;
- 2) *variante prevalentemente ectasica*, in cui il dotto principale ed i dotti ectasici di secondo ordine si presentano ripieni di muco, ma con mucosa "piatta". Microscopicamente, l'epitelio è di tipo colonnare mucosecerno, con differenziazione polimorfa. Il grado di displasia epiteliale è l'elemento che consente la sottoclassificazione in: adenomi (atipia di grado lieve), borderline (atipia di grado moderato), carcinomi (atipia severa). Il carcinoma invasivo è frequentemente di tipo "colloide" (caratterizzato da andamento clinico indolente) e solo raramente di tipo "tubulo-ghiandolare" (caratterizzato da comportamento aggressivo di tipo intermedio quello di tipo intestinale, mentre quello di tipo bilio-pancreatico è sovrapponibile a quello del carcinoma duttale classico).

*Caratteristiche immunofenotipiche e molecolari*

Le papille vengono distinte in: 1 *papille di tipo intestinale* (30-40% dei casi): presentano spiccata similitudine con le strutture villose degli adenomi del colon, esprimono il marcatore intestinale CDX2 (specifico gene di programmazione cellulare di tipo intestinale, con funzione di soppressore tumorale) e MUC2 (glicoproteina di tipo intestinale prodotta esclusivamente dalle cellule intestinali tipo goblet, con funzione di soppressore tumorale). Le neoplasie con questi caratteri, anche se possono coinvolgere estesamente il sistema duttale e raggiungere cospicue dimensioni, vengono di solito classificate come borderline o CIS e, anche quando si associano a trasformazione carcinomatosa, presentano un andamento clinico indolente. Il carcinoma, infatti, è quasi sempre di tipo colloide, con espressione dello

stesso fenotipo non aggressivo: negatività per MUC1 e positività per MUC2 e CDX2 (48, 54); 2 *papille di tipo bilio-pancreatico* (20% dei casi): hanno architettura più complessa e ramificata, un rivestimento epiteliale sovrapponibile a quello osservato nel carcinoma pancreatico e delle vie biliari, non esprimono MUC2 e CDX2, mentre esprimono il MUC1. La maggior parte di queste neoplasie sono caratterizzate da displasia ad alto grado e frequentemente associate a carcinoma infiltrante con caratteristiche morfologiche ed immunofenotipiche sovrapponibili all'adenocarcinoma duttale classico. Le mucine MUC1, considerate marcatori di aggressività biologica, sono una famiglia di glicoproteine di membrana con un ruolo importante in molte funzioni essenziali, tra queste: mantenere l'integrità del lume ghiandolare, regolare l'interazione tra cellula-cellula, cellula-stroma e conferire immunoresistenza (55); 3 *papille di tipo gastrico* (30-40% dei casi): caratterizzate da epitelio simile alle foveole gastriche, negativo per CDX2, MUC1 e MUC2 e positivo per MUC5AC (48). Queste lesioni sono di solito piccole, coinvolgono prevalentemente i dotti periferici, presentano atipie a basso grado e non si associano generalmente a trasformazione carcinomatosa; 4 *papille di tipo oncocitico*: caratterizzate da epitelio rivestito da cellule con intenso citoplasma granulare eosinofilo, con espressione immunofenotipica prevalentemente negativa per le mucine riportate precedentemente o con espressione solo focale delle stesse (56). Le neoplasie IPMN si distinguono molecularmente dal carcinoma duttale per una ridotta incidenza di mutazioni di K-ras, p53, p16 e conservazione dell'espressione di DPC4 e per l'inattivazione in un terzo dei pazienti del gene STK1/LKB1 (57). La progressione da lesioni a basso grado fino a giungere al carcinoma infiltrante è da considerarsi non certamente in senso lineare come per la sequenza adenoma-carcinoma classica del colon. Considerando, infatti, l'eterogeneità sia morfologica sia immunofenotipica il processo di trasformazione neoplastica deve passare attraverso specifici programmi di transdifferenziazione intestinale (IPMN di tipo indolente) o pancreato-biliare (IPMN di tipo aggressivo). Anche il carcinoma associato alle IPMN è immunofenotipicamente eterogeneo anche per quanto riguarda l'espressione di DPC4/SMAD4, gene soppressore tumorale localizzato sul cromosoma 18q. Mentre DPC4 è costantemente espresso nei carcinomi colloidali MUC2 e CDX2 positivi, la delezione del cromosoma 18q e la perdita di funzione del gene DPC4 caratterizza

invece in eguale proporzione (50%) sia gli adenocarcinomi classici, sia i carcinomi tubulo-ghiandolari MUC1 positivi, insorti nelle IPMN. Poiché l'espressione di DPC4 nei carcinomi duttali correla con una prognosi migliore è possibile ipotizzare che anche la buona prognosi di queste neoplasie sia, almeno in parte, riconducibile alla mantenuta espressione di DPC4. Da studi di profilo di espressione genica, la variante infiltrante delle IPMN si caratterizza per la selettiva espressione di quattro geni: claudina 4, CXCR4, S100A4 e mesotelina. In particolare, l'S100A4 e la mesotelina sono presenti nel 73% delle neoplasie invasive ed in nessuna delle IPMN non invasive. Per la variante oncocitica dell'IPMN, in considerazione dell'eccessivo accumulo di mitocondri, si ipotizza una carcinogenesi distinta e verosimilmente riconducibile a stress ossidativi. Il carcinoma invasivo non presenta anomalie dei geni soppressori tumorali p53, p16 e SMAD4/DPC4 (55). La diagnosi differenziale delle neoplasie IPMN-centrali si pone in prima istanza con la pancreatite cronica e con l'adenocarcinoma duttale, mentre per le neoplasie IPMN-periferiche si pone principalmente con le neoplasie mucinose cistiche e le cisti da ritenzione, le pseudocisti infiammatorie e la distrofia cistica della parete duodenale.

**3) Neoplasie mucinose cistiche (*Mucinous Cystic Neoplasms, MCN*):** neoplasie con spiccatissima prevalenza nel sesso femminile, capsulate, senza rapporto con il sistema duttale, prevalentemente localizzate nella coda del pancreas e caratterizzate dalla presenza di stroma di tipo ovarico (46, 55). Le MCN rappresentano circa il 30% delle neoplasie cistiche del pancreas. Macroscopicamente, sono neoformazioni uni o multiconcamerate, rotondeggianti, dotate di pseudocapsula e prive di connessioni con il dotto principale di Wirsung o con i dotti di secondo ordine. Le dimensioni possono variare da 2 fino a 35 cm (diametro medio 12 cm). La superficie interna delle cisti appare liscia nelle forme benigne, mentre la presenza di escrescenze papillari e di aree solide contraddistingue, di solito, i cistoadenocarcinomi. Microscopicamente, sono presenti due distinte componenti: 1) epitelio colonnare di rivestimento, muco-secernte; 2) stroma sottoepiteliale di "tipo ovarico". L'epitelio colonnare presenta spesso metaplasia di tipo foveolare gastrico, pilorico od intestinale. All'interno delle cisti si possono costituire delle vere e proprie formazioni papillari. Le neoplasie vengono suddivise in base al grado di displasia dell'epitelio in adenomi (atipia di grado lieve), forme

borderline (atipia di grado moderato) ed adenocarcinomi non-invasivi (atipia severa). I MCN-invasivi, di solito, presentano caratteri analoghi a quelli dell'adenocarcinoma duttale del pancreas, anche se sono state riportate forme speciali di carcinoma adenosquamoso, carcinoma anaplastico, carcinoma a cellule simil-osteoclastiche e chorioncarcinoma. Tutte queste forme speciali possono assumere aspetto di noduli stromali. L'estensione dell'infiltrazione carcinomatosa rappresenta un elemento prognostico importante; focolai invasivi circoscritti nel contesto della neoplasia, senza infiltrazione della capsula tumorale, presentano buona prognosi (58). Le MCN devono essere resecate radicalmente e quindi la loro diagnosi differenziale pre-operatoria deve prendere in considerazione formazioni cistiche di origine infiammatoria, cisti da ritenzione e la variante macrocistica del cistoadenoma sieroso, per le quali non è prevista generalmente indicazione chirurgica. Immunoistochimicamente, la componente epiteliale presenta positività per le citocheratine 7,8,18 e 19, EMA, CA19-9, DUPAN-2 e CEA. Parallelamente alla differenziazione morfologica possono presentare positività per le mucine di tipo gastrico M1, PGII ed intestinale CAR-5 e M3SI. Le neoplasie non invasive sono positive per le mucine MUC5AC, per DPC4 e negative per le mucine MUC1, mentre la componente carcinomatosa infiltrante è negativa per DPC4 e positiva per MUC1. Le cellule dello stroma di tipo ovarico presentano positività per la vimentina, l'actina muscolo specifica, per i recettori degli estrogeni, del progesterone e per l'alfa-inibina (55). Le modificazioni molecolari (59) comprendono mutazioni del gene K-ras, presenti fin dalle fasi iniziali di sviluppo della neoplasia e progressivamente aumentate di pari passo con l'incremento del grado di displasia. Anomalie dei geni oncosoppressori, p53, p16, DPC4 caratterizzano invece le fasi avanzate di malattia, con maggior espressività nei focolai carcinomatosi invasivi. Studi di gene expression profiling hanno consentito di documentare una sovraespressione genica in 114 geni conosciuti nella componente epiteliale neoplastica rispetto all'epitelio normale (inclusi i geni S100P, PSCA, c-myc, STK6/STK15, catepsina E e pepsinogeno C) e la sovraespressione di geni implicati nel metabolismo degli estrogeni (STAR e ESR1) nello stroma di tipo ovarico (60).

**Carcinoma a cellule acinose.** Il carcinoma a cellule acinose è una neoplasia rara (1% delle neoplasie del pancreas esocrino), che prevale nel sesso maschile e nell'età

avanzata, anche se sono stati descritti sporadici casi infantili. Sebbene siano descritte varianti cistiche, la maggior parte delle lesioni sono prevalentemente solide. Microscopicamente, la neoplasia presenta sia aspetti solidi, sia trabecolari e simil-acinosi ed è caratterizzata da cellule con abbondante citoplasma eosinofilo, granulare, Pas-positivo e nucleo rotondeggiante con evidente nucleolo. La presenza di atipie e necrosi consente di differenziare le varianti cistiche, classificate come cistoadenocarcinomi acinari, dalle forme cistiche benigne o cistoadenoadenomi a cellule acinose. La differenziazione di tipo acinare è dimostrabile con la immunoreattività per la tripsina, mentre possono risultare negative le indagini per l'amilasi e la lipasi. Raramente può essere presente una componente cellulare neoplastica con differenziazione endocrina. Quando tale componente supera il 30%, il tumore si classifica come carcinoma misto acinoso-endocrino; le caratteristiche anatomo-cliniche tuttavia non differiscono in maniera significativa dalla forma classica (61). Il carcinoma a cellule acinose presenta caratteristiche molecolari distinte rispetto sia al carcinoma duttale, assenza di mutazioni di K-ras, sovraespressione e mutazioni di p53, perdita di DPC4 e p16, sia alle neoplasie endocrine. Le anomalie più caratteristiche sono rappresentate dalla perdita di 4q e 16q e da anomalie a carico di APC/ $\beta$ -catenina nel 25% dei casi (62).

**Pancreatoblastoma.** E' un tumore raro, ma rappresenta il tumore pancreatico più frequente dell'età infantile. Presenta una distribuzione bimodale, con un gruppo di età media intorno ai 3-5 anni ed uno di età media intorno ai 25-30 anni (46). Macroscopicamente, la lesione si può presentare sia come una formazione ben circoscritta, frequentemente di dimensioni considerevoli (fino a 20 cm), sia a margini sfumati ed infiltrativi. Istologicamente, le due componenti diagnosticamente rilevanti sono rappresentate dalla componente prevalentemente di tipo acinare e dai caratteristici corpuscoli squamoidi composti da cellule a nucleo chiaro ricco di biotina. Più raramente, possono essere presenti componenti epiteliali meno differenziate (tipo adenocarcinomatose), associate ad elementi mesenchimali con differenziazione condroide od ossea. Le caratteristiche molecolari di questa neoplasia sono rappresentate dalle anomalie dei geni APC/ $\beta$ -catenina, presenti nel 67% dei casi, dalla



delezione 11p, mentre sono assenti mutazioni di K-ras, p53 e raramente si osserva perdita di espressività di DPC4 (63).

**Neoplasie sierose cistiche.** Sono forme quasi esclusivamente benigne, che rappresentano l'1-2% dei tumori esocrini del pancreas ed il 30-40% di quelli cistici del pancreas. Di solito sono lesioni di grandi dimensioni, ben circoscritte, che si riscontrano in entrambi i sessi, con prevalenza nelle donne di età compresa tra i 60 e 70 anni (46). Clinicamente possono essere sporadici oppure rappresentare una delle lesioni della sindrome di Von Hippel-Lindau (VHL) (64). Si distinguono cinque varianti clinico-patologiche (46):

- 1) *cistoadenoma sieroso (CAS) microcistico* o forma classica: è la variante più rappresentata (60-70%), con prevalenza nella coda del pancreas. Il tumore si presenta a margini bozzuti, ma ben circoscritto e frequentemente con cicatrice centrale che, assieme alla presenza di innumerevoli piccole cisti, del diametro variabile da 1 mm a 1-2 cm, conferisce alla lesione il tipico aspetto a spugna, ben riconoscibile anche alle indagini radiologiche.
- 2) *CAS macrocistico o oligocistico* (circa 30% dei casi), con prevalenza nella testa del pancreas e presenza di poche, comunque in numero definito, cisti del diametro > 2 cm, che possono raggiungere anche 15-20 cm, ed assenza di cicatrice stellata centrale. La diagnosi differenziale pre-operatoria con le neoplasie mucinose cistiche non è quasi mai possibile; tale difficoltà spiega l'elevata incidenza di resezioni chirurgiche biologicamente non necessarie vista la natura relativamente indolente del CAS.
- 3) *CAS solido*: la conoscenza delle sue caratteristiche è tuttora scarsa per il numero limitato di casi riportati in letteratura. E' di solito una lesione di piccole dimensioni, 2-4 cm di diametro, costituita da innumerevoli piccolissime cisti che conferiscono un aspetto solido. La diagnosi differenziale pre-operatoria con una neoplasia endocrina è estremamente difficoltosa.
- 4) *Cistoadenocarcinoma sieroso*: presenta caratteristiche morfologiche indistinguibili dalle forme benigne o solo con minime anomalie citologiche. L'aspetto discriminante è rappresentato dalla crescita infiltrativa e dall'interessamento degli organi contigui come stomaco, fegato, milza e talora la presenza di invasioni vascolari e di metastasi linfonodali ed epatiche.
- 5) *Neoplasie cistiche sierose associate a sindrome di Von Hippel Lindau-VHL*: presenti nel 60-80% dei pazienti, non presentano predilezione di sesso, sono frequentemente multifocali e non raramente possono coinvolgere l'intero organo. Alle lesioni

pancreatiche si associano frequentemente cisti multiple al fegato, polmone, rene, milza e epididimo. Microscopicamente, ed a prescindere dalla presentazione macroscopica o dall'associazione con VHL, tutte le lesioni sono caratterizzate dal tipico epitelio cubico con citoplasma chiaro ricco di glicogeno (PAS-positivo, diastasi sensibile), privo di atipia e di evidente attività replicativa. *Caratteri immunofenotipici e molecolari*: sebbene le neoplasie sierose siano per molti aspetti eterogenee, oltre ad essere caratterizzate da un solo tipo cellulare, presentano un identico immunofenotipo. Le cellule presentano positività immunohistochimica per le citocheratine 7,8,18 e 19, diffusa positività per EMA e negatività per CEA, vimentina e tutti i marcatori di differenziazione endocrina ed acinare. Recentemente, è stata segnalata positività per l'enolasi neurone specifica (NSE), l'alfa inibina, il MUC6 e focale positività per MUC1 (54). Le mucine MUC2 e MUC5AC sono invece sempre negative. Il 40% dei pazienti con lesione sporadica presenta perdita di eterozigotà al cromosoma 3p (dove è localizzato il gene VHL, in posizione 3p25.5), con mutazioni nel 22% dei casi e delezione del cromosoma 10q nel 50% dei casi (65). Le caratteristiche peculiari di questa neoplasia, le cellule chiare ricche di glicogeno e la ricca vascolarizzazione, potrebbero trovare una patogenesi nella cascata di eventi molecolari associati alla Von Hippel-Lindau pathway. Le tappe principali sono rappresentate dall'induzione del fattore di ipossia HIF-1, con accumulo di glicogeno cellulare e l'iperespressione del VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) e conseguente neoangiogenesi (66). Le neoplasie sierose non presentano mutazioni del K-ras ed alterazioni dei geni soppressori tumorali p16, p53, DPC4.

**Tumore solido-pseudopapillare.** E' una neoplasia rara (1-2% dei tumori esocrini), a bassa malignità, con spiccata predilezione per le donne di giovane età. Seppure non sia stata ancora identificata l'ipotetica cellula di origine, è una delle neoplasie pancreatiche meglio caratterizzate dal punto vista molecolare (46). Macroscopicamente è una neoformazione solida, rotondo-ovalare, di dimensioni variabili da 2 a 20 cm, ben circoscritta che può presentare, in proporzione variabile da caso a caso, una trasformazione cistica, per effetto di fenomeni emorragici e necrotico-regressivi.

Microscopicamente, il tumore è composto da una commistione di aree solide, cistiche

e pseudopapillari. Le cellule neoplastiche sono monomorfe con nuclei rotondeggianti e citoplasma granulare, con globuli ialini, PAS-positivi. Le mitosi sono virtualmente assenti e l'attività proliferativa estremamente bassa (Ki-67 < 2%). Immunofenotipicamente, il marcatore diagnostico è rappresentato dalla positività nucleare per la  $\beta$ -catenina. La neoplasia presenta positività costante per la vimentina, NSE, CD56, CD10, alfa-1-antichimotripsina, a-1-antitripsina e negatività per le citocheratine (in rari casi, è possibile una focale, debole positività), cromogranina e per gli ormoni pancreatici. La positività per i recettori per il progesterone nella maggioranza delle cellule neoplastiche e la spiccata predilezione per il sesso femminile suggeriscono l'ipotesi di un possibile ruolo patogenetico di questo ormone. L'analisi molecolare mostra mutazione del gene della  $\beta$ -catenina sul cromosoma 3p in più del 90% dei casi. La proteina mutata si concentra nel citoplasma e nel nucleo delle cellule neoplastiche, attivando una cascata di geni che promuovono la progressione tumorale. La mancata interazione con la concomitante aberrazione della E-caderina sulla membrana cellulare, fondamentale per la regolazione dell'interazione cellula-cellula, giustifica la scarsa coesione delle cellule neoplastiche e la trasformazione cistica (63). La neoplasia non presenta le classiche mutazioni di K-ras, né anomalie di p53, DPC4 e p16 che caratterizzano il carcinoma duttale.

**Stadiazione TNM.** Per quanto riguarda la stadiazione, in Occidente è abitualmente utilizzata quella proposta dalla American Joint Committee on Cancer (AJCC).

<b>Definizioni</b>			
<i>Tumore primitivo (T)</i>			
TX	Tumore primitivo non definibile		
T0	Tumore primitivo non evidenziabile		
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>		
T1	Tumore limitato al pancreas, di dimensione massima $\leq 2$ cm		
T2	Tumore limitato al pancreas, di dimensione massima $> 2$ cm		
T3	Tumore che si estende oltre il pancreas ma senza interessamento del tronco celiaco o dell'arteria mesenterica superiore		
T4	Tumore che infiltra il tronco celiaco o l'arteria mesenterica superiore (neoplasia primitiva inoperabile)		
<i>Linfonodi Regionali (N)</i>			
NX	I linfonodi regionali non sono valutabili		
N0	Linfonodi regionali esenti da metastasi		
N1	Metastasi nei linfonodi regionali		
<i>Metastasi a distanza (M)</i>			
MX	Metastasi a distanza non accertabili		
M0	Metastasi a distanza assenti		
M1	Metastasi a distanza presenti		
<b>Raggruppamento in stadi</b>			
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
III	T4	Qualsiasi N	M0
IV	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M1

**Margini di resezione.** Per quanto riguarda il campionamento del pezzo operatorio e la valutazione dei margini di resezione, non esiste ancora un metodo univoco e standardizzato. Il mancato riconoscimento di neoplasia residua in corrispondenza dei margini di resezione chirurgica dipende in maniera diretta dalla modalità di campionamento del pezzo operatorio e potrebbe spiegare l'alta percentuale di recidive riportata in letteratura. La precisa definizione e valutazione dei margini di resezione chirurgica rappresenta un punto cruciale per la corretta stadiazione della neoplasia. I margini di resezione comprendono: 1 trancia di resezione della via biliare principale; 2 trancia di resezione del pancreas; 3 trancia di resezione duodenale prossimale in caso di duodenocefalopancreasectomia (DCP) con conservazione del piloro; 4

margine di resezione retro-peritoneale. La trancia di resezione chirurgica della via biliare principale e del pancreas dovrebbero essere esaminate in sede intra-operatoria su sezioni al criostato; l'eventuale positività deve, infatti, suggerire l'ampliamento del margine di exeresi. Il margine di resezione retroperitoneale, che rappresenta il vero "punto caldo" nella stadiazione patologica, viene definito come il tessuto adiposo peripancreatico localizzato posteriormente e lateralmente all'arteria mesenterica superiore e macroscopicamente identificato sul pezzo operatorio in corrispondenza di una ristretta area, a maggior asse longitudinale, in corrispondenza della quale la superficie posteriore della testa pancreatica appare cruentata chirurgicamente (67). A causa della difficoltà di identificarlo su sezioni istologiche, la sua superficie dovrebbe essere colorata con inchiostro di china prima della fissazione del pezzo operatorio in formalina e successivamente campionato in toto mediante prelievi seriatati e condotti perpendicolarmente all'asse principale del margine stesso. L'infiltrazione carcinomatosa nello spazio retro-peritoneale rappresenta la sede elettiva di diffusione del carcinoma duttale.

### ***1.2.3 Dalla Stadiazione al Management Terapeutico***

#### **Neoplasie del colon-retto:**

Al fine di pianificare il management terapeutico del tumore del **Colon** è necessaria una corretta stadiazione patologica. Per i tumori di piccole dimensioni la terapia di scelta è la colectomia con la rimozione in blocco dei linfonodi regionali (68).

Per i tumori allo *stadio I* la terapia di scelta è la chirurgia, anche nello *stadio Iia* (*T1-T2, N0, M0*) viene eseguita esclusivamente la terapia chirurgica, nei pazienti allo stadio IIB (*T3, N0, M0*) a basso rischio di disseminazione linfonodale dopo chirurgia si può procedere con uno stretto follow-up basato sull'osservazione. Nei pazienti con tumore allo stadio IIB (*T3* ad alto rischio di invasione linfatica, *T4, N0, M0*) la terapia di scelta è la chirurgia radicale seguita da chemioterapia.

Nello stadio III la terapia consiste nella chirurgia seguita dalla chemioterapia (69). I protocolli di chemioterapia utilizzati sono diversi e si stanno susseguendo negli anni. Gli studi IMPACT e NCCTG propongono l'utilizzo di 5-fluorouracile (5-FU) in associazione a leucovorina (LV). Questa terapia migliora la prognosi in modo

significativo. Lo studio MOSAIC ha invece aggiunto alla terapia convenzionale (5-FU/LV) l'oxaliplatino (FOLFOX). I pazienti trattati con l'aggiunta di oxaliplatino hanno una prognosi migliore rispetto ad i pazienti trattati con sola 5-FU/LV anche se come effetto collaterale si aggiunge la neuropatia periferica. Un altro agente utilizzato in un trial clinico è stato l'Irinotecan (FOLFIRI) con dei risultati che sono comunque sovrapponibili a quelli raggiunti dallo schema terapeutico FOLFOX (70).

Nello stadio IV la terapia prevede l'utilizzo della chirurgia laddove sia possibile l'asportazione delle metastasi (polmone e soprattutto fegato) in associazione alla chemioterapia, molte volte la terapia può ridursi a semplice palliazione. Negli stadi più avanzati l'utilizzo di farmaci biologici sta avendo molto successo. I farmaci biologici probabilmente rappresentano una strada percorribile nella terapia molecolare del cancro.

I farmaci biologici ad oggi utilizzati sono il Bevacizumab un anticorpo monoclonale diretto contro il VEGF (71). L'utilizzo di questo farmaco lascia tuttavia aperto il problema delle micrometastasi sulle quali non avrebbe efficacia a causa del fatto che per le loro dimensioni non hanno una vascolarizzazione propria: alla cessazione della terapia le cellule potrebbero riprendere la loro normale crescita. Altri farmaci biologici approvati dalla Food and Drug Administration sono il Cetuximab ed il Panitumumab diretti contro l'EGFR, l'Edrecolomab diretto contro una glicoproteina (17-1A) espressa dalle cellule epiteliali cancerose. L'utilizzo dell'IFN-alfa seppure ha dato risultati promettenti, non viene usato a causa del notevole aumento della tossicità e della sintomatologia extraintestinale.

Per quanto riguarda il tumore del **Retto** i protocolli terapeutici sono leggermente diversi grazie al fatto che la posizione anatomica permette un trattamento con radioterapia, tuttavia a causa della mancanza di rivestimento peritoneale, l'invasione nello spazio circostante è più precoce ed il trattamento chirurgico deve necessariamente mirare a ottenere la "sterilizzazione" neoplastica dei margini. Così come per il tumore localizzato al colon il fattore che influenza notevolmente la prognosi è il coinvolgimento linfonodale e l'estensione loco – regionale della malattia. I tumori allo stadio clinico I e IIA (T1-T2-T3, N0, M0) possono essere trattati con la sola chirurgia mediante resezione trans-addominale o escissione trans-anale. Per i tumori T1-T2 in cui la stadiazione clinica non è in grado di evidenziare il

coinvolgimento linfonodale (Nx) le linee guida NCCN ritengono necessario associare un trattamento chemioterapico analogo a quello somministrato per il tumore del Colon (72) anche se si discute sulla possibilità di utilizzare chemio – radioterapia neoadiuvante. Nei tumori in cui la stadiazione clinica accerti l'interessamento linfonodale si preferisce utilizzare la chemio – radioterapia neoadiuvante a cui segue la chirurgia e la chemioterapia adiuvante. La terapia neoadiuvante fa sì che si ottenga un “downstaging” tumorale, ciò permette non solo di migliorare la sopravvivenza del paziente ma anche di preservare lo sfintere anale migliorando la qualità di vita dello stesso.

### **Neoplasie del Pancreas:**

**Chirurgia resettiva standard:** Il trattamento chirurgico è l'unica opportunità curativa per i pazienti con neoplasie maligne del pancreas. Infatti, recenti lavori riportano una sopravvivenza a 5 anni variabile dal 15% al 25% dopo resezione curativa (73). Il problema più rilevante è che solo una piccola parte dei pazienti (circa il 20%) affetti da cancro del pancreas è resecabile al momento della diagnosi (74). La duodenocefalopancreasectomia (DCP) è la procedura chirurgica standard per questo tumore, anche perché la maggior parte dei casi si localizza nella testa del pancreas. Nonostante i continui progressi della chirurgia in ambito pancreatico, vi è la necessità di nuovi approcci terapeutici in questi pazienti. Dati incoraggianti provengono invece da studi che hanno valutato la possibilità di approccio multimodale con chemioterapia adiuvante.

**Chemioterapia adiuvante:** La scarsa sopravvivenza a 5 anni nei pazienti resecati dipende essenzialmente dall'aggressività biologica e dalla precoce metastatizzazione. Esiste quindi un forte razionale per un trattamento adiuvante, ma attualmente non esiste uno standard ampiamente condiviso. Sono stati condotti numerosi studi clinici controllati (Es: studio ESPAC-1 i cui autori concludono che il trattamento standard dopo resezione radicale è rappresentato da chemioterapia sistemica con 5FU/AF (73); Studio CONKO-001 randomizzato multicentrico a due bracci: Gemcitabina (GEM) verso osservazione. Sopravvivenza libera da malattia e OS sono risultate aumentate nel gruppo di pazienti sottoposti a 6 mesi di terapia con GEM (13.4 vs 6.9 mesi,  $p<0.001$ ) ( 22.8 vs 20.2 mesi,  $p=0.005$ )

(75).

**Chemioterapia neoadiuvante (malattia resecabile):** Ha come principale obiettivo quello di aumentare l'OS rispetto alla sola chirurgia e di evitare la chirurgia demolitiva a quel gruppo di pazienti ad elevata probabilità di recidiva precoce. L'OS dei pazienti sottoposti a sola chirurgia è inferiore a 20 mesi, mentre è attorno a 24 mesi, se l'intervento è seguito da una chemioterapia adiuvante. La malattia occulta metastatica è stimata tra il 20% ed il 30% nei pazienti con malattia resecabile ed è responsabile delle recidive precoci post-resezione. Attualmente, non vi sono studi di fase III che abbiano dimostrato un vantaggio di sopravvivenza in pazienti sottoposti ad un trattamento chemioterapico pre-operatorio rispetto alla sola chirurgia. Studi di fase II hanno dimostrato che circa il 25-35% dei pazienti resecabili sottoposti a trattamenti neoadiuvanti combinati di radiochemioterapia non vengono operati per progressione di malattia; il tempo medio che intercorre tra l'inizio del trattamento combinato e la chirurgia è di 4 mesi circa.

In conclusione:

- *la terapia standard nei pazienti operabili è la chirurgia*
- *non esiste un trattamento standard pre-operatorio*
- *la terapia neoadiuvante può selezionare i pazienti da non sottoporre a chirurgia*
- *un trattamento sistemico con GEM e Cisplatino è fattibile, ma con maggiore incidenza di recidive locali rispetto alla chemio/radioterapia*
- *la terapia neoadiuvante è da considerare all'interno di studi clinici controllati*

**Chemioterapia della malattia localmente avanzata:** La sopravvivenza a 5 anni nei pazienti resecati è compresa tra il 10-20%, mentre è uguale a zero in quelli non resecati (76).

L'obiettivo principale di un trattamento nella malattia localmente avanzata è di ottenere un down-staging, così da renderla resecabile. In generale, si può affermare che un trattamento chemioterapico sistemico può determinare sia un controllo locale di malattia sia un controllo a distanza, prevenendo lo sviluppo di micrometastasi; il trattamento radioterapico può impattare maggiormente sul controllo locale della malattia.

L'associazione radiochemioterapia è il trattamento più utilizzato. La strategia che



sembra garantire un miglior controllo locale della malattia ed una miglior sopravvivenza consiste in un trattamento chemioterapico sistemico a base di GEM per 3 mesi seguito, nei pazienti che non hanno manifestato una rapida progressione di malattia, da un trattamento radio/chemioterapico (15). I farmaci radiosensibilizzanti più impiegati sono il 5FU in infusione continua e GEM. In conclusione:

- *l'associazione radiochemioterapia è quella più utilizzata*
- *la sequenza ottimale è rappresentata da: chemioterapia a base di GEM per 3 mesi seguita da radiochemioterapia nei pazienti non in progressione*
- *è possibile l'uso della GEM come radio-sensibilizzante.*

**Chemioterapia della malattia metastatica:** L'OS dei pazienti con malattia metastatica oscilla tra 4 e 6 mesi. L'obiettivo primario del trattamento è rappresentato dal prolungamento dell'OS. E' stato documentato che la chemioterapia migliora l'OS rispetto alla miglior terapia di supporto. La GEM è diventata il farmaco di riferimento in seguito ad uno studio randomizzato, che ne ha dimostrato la superiorità in termini di OS rispetto al 5FU (5.65 vs 4.41 mesi  $p=0.025$ ).

Tuttavia, un altro studio randomizzato in cui GEM è stata confrontata con 5FU/AF e due meta-analisi non confermano il vantaggio (77).

In conclusione:

- *il ruolo della GEM in monochimioterapia in pazienti con malattia sistemica andrebbe limitato a pazienti con performance ridotto;*
- *regimi a 2 farmaci con GEM associata a derivati del platino o CAP rappresentano schemi utilizzabili in tutti i Centri oncologici;*
- *regimi a 3 farmaci intra-arteriosi o 4 farmaci sistemici possono essere tenuti in considerazione in Centri specializzati ed in pazienti con buon performance status;*
- *regimi di prima linea non contenenti GEM possono essere tenuti in considerazione.*

### **Radioterapia**

**Radioterapia post-operatoria** Le opzioni di trattamento adiuvante per il carcinoma pancreatico (CP) sono rappresentate dall'associazione radiochemioterapica e dalla chemioterapia esclusiva. In particolare, il ruolo della radioterapia adiuvante non è stato ancora chiarito ed è tuttora argomento di vivace dibattito, essendo presenti in letteratura risultati discordanti. Sono stati condotti diversi studi randomizzati e

due meta-analisi per valutare l'impatto della radioterapia adiuvante. La meta-analisi di Khanna et al. (78) ha valutato l'efficacia della radiochemioterapia adiuvante rispetto alla chirurgia esclusiva. Questa analisi, che ha incluso 5 studi prospettici, ha documentato un vantaggio in termini di sopravvivenza a 2 anni del 12% ( $p=0.022$ ) nei pazienti sottoposti a radiochemioterapia. La meta-analisi di Stocken et al. (79) ha incluso 5 studi randomizzati che valutavano sia la chemioterapia sia la radiochemioterapia adiuvante. Dall'analisi è risultato che la chemioterapia era associata ad una riduzione del 25% del rischio di morte ( $HR=0.75$ ;  $p=0.001$ ) con una sopravvivenza mediana di 19 mesi nei pazienti sottoposti a chemioterapia rispetto ai 13.5 mesi del resto della popolazione in studio. Da questa analisi la radiochemioterapia non risulta associata a riduzioni statisticamente significative del rischio di morte ( $HR=1.09$ ;  $p=0.43$ ). Infatti, la sopravvivenza mediana nei pazienti sottoposti a radiochemioterapia è stata di 15.8 mesi rispetto a 15.2 mesi negli altri pazienti. Tuttavia, la radiochemioterapia si è dimostrata più efficace rispetto alla chemioterapia nei pazienti con margini di resezione chirurgica positivi (R1).

*Radiochemioterapia pre-operatoria nelle neoplasie resecabili:* Sono stati condotti diversi studi sulla radioterapia pre-operatoria (neoadiuvante) nelle neoplasie del pancreas potenzialmente resecabili (80), anche se mancano studi randomizzati. Il rationale nell'utilizzo della radioterapia pre-operatoria si basa sui vantaggi teorici rispetto ai trattamenti post-operatori: possibilità di agire su tessuti dotati di migliore ossigenazione (con maggiore efficacia della radioterapia), sterilizzazione del campo operatorio prima dell'intervento, riduzione delle dimensioni della neoplasia e conseguente incremento del tasso di interventi radicali. Il ritardo nell'esecuzione del trattamento chirurgico è invece considerato uno svantaggio. Un'analisi retrospettiva condotta alla M.D. Anderson Cancer Center da Spitz et al. non ha confermato tuttavia questo svantaggio teorico nei pazienti con neoplasia resecabile. Infatti, il trattamento pre-operatorio ha mostrato una migliore compliance rispetto a quello post-operatorio, dal momento che quest'ultimo non è stato eseguito in circa un quarto dei pazienti a causa delle complicanze post-operatorie.

*Radioterapia intraoperatoria (IORT):* La IORT prevede l'irradiazione del letto tumorale durante l'intervento chirurgico. Alcuni studi hanno suggerito che la IORT

sarebbe in grado di ridurre l'incidenza di recidive locale nelle neoplasie pancreatiche. La IORT nell'ambito delle neoplasie pancreatiche è principalmente indicata come trattamento adiuvante alla chirurgia. Dati clinici hanno dimostrato un suo ruolo nell'aumentare il controllo locale di malattia, senza però ottenere un miglioramento della OS.

### **Approccio terapeutico rispetto alla stadiazione:**

La scelta complessiva degli strumenti terapeutici dipende dalla sede e dallo stadio del tumore, dall'età e dalle condizioni generali del paziente.

#### **Stadio I**

Le opzioni terapeutiche sono le seguenti:

- duodenocefalopancreasectomia;
- pancreasectomia totale;
- pancreasectomia distale;
- chirurgia seguita da chemioterapia e radioterapia;
- chirurgia seguita da sola chemioterapia.

#### **Stadio II**

Le opzioni terapeutiche sono le seguenti:

- pancreasectomia parziale o totale, con o senza chemioterapia e radioterapia.
- radioterapia esterna più chemioterapia;
- chirurgia o altre terapie per alleviare la sintomatologia;

#### **Stadio III**

È solitamente considerato non operabile (convenzionalmente si definisce 'localmente avanzato non resecabile') a causa dell'invasione dei vasi arteriosi che circondano il pancreas. In questo caso le opzioni terapeutiche sono le seguenti:

- chemioterapia;
- chemioterapia e radioterapia;
- chemioterapia e terapia biologica sperimentale;
- terapia di supporto (nutrizione endovenosa);

- terapia palliativa per alleviare i sintomi (chirurgia palliativa, drenaggio biliare interno o esterno per ridurre l'ittero, terapia del dolore).
- Esiste una piccola percentuale di casi in cui il tumore potrebbe comunque essere suscettibile di intervento chirurgico. In questo caso le opzioni terapeutiche sono:
- chemioterapia preoperatoria per tentare di ridurre le dimensioni del tumore e renderlo così operabile;
- intervento chirurgico immediato per consentire al chirurgo di valutare direttamente l'estensione reale della malattia all'interno dell'addome ed eventualmente asportare il tumore.

Se le due opzioni precedenti non hanno esito positivo, le opzioni terapeutiche sono le stesse descritte per il tumore non operabile.

#### **Stadio IV**

Le opzioni terapeutiche sono le seguenti:

- chemioterapia;
- terapie contro il dolore e altri sintomi;
- chirurgia o altre terapie palliative, vale a dire miranti a ridurre i sintomi;
- partecipazione a studi clinici miranti a valutare l'efficacia della chemioterapia o della terapia biologica.

#### **Cancro del pancreas recidivante**

Le opzioni terapeutiche sono le seguenti:

- chemioterapia;
- radioterapia se non è stata effettuata in precedenza e se la recidiva è locale;
- chirurgia o altre terapie palliative, vale a dire miranti a ridurre i sintomi;
- radioterapia esterna per ridurre i sintomi;
- terapia contro il dolore;
- altri interventi medici volti ad alleviare i sintomi;

- partecipazione a studi clinici miranti a valutare l'efficacia della chemioterapia o della terapia biologica.

### 1.3 Dal Trattamento al Follow-up

#### Neoplasie Colon-rettali:

In seguito alla terapia è necessario che venga seguito uno scrupoloso follow-up per valutare le possibili complicanze, e le eventuali ricorrenze che possono essere trattate chirurgicamente. Per quanto riguarda il tumore localizzato al **Colon** molti studi hanno dimostrato che nello stadio II e III un follow-up intensivo migliora la prognosi (81). L'80% circa delle ricorrenze tumorali per i tumori allo stadio II o III si verificano entro il terzo anno dall'escissione chirurgica (82). Per questi pazienti è consigliato un esame obiettivo ogni 3-6 mesi per i primi due anni dopo l'intervento chirurgico e quindi ogni 6 mesi per un totale di 5 anni; il CEA deve essere dosato ogni 3-6 mesi per i primi due anni e quindi poi ogni 6 mesi per i successivi 5 anni. La colonscopia deve essere eseguita ad 1 anno dall'intervento quindi poi dopo 3 anni. La TC deve essere eseguita 1 volta ogni anno per i primi 3 anni. La PET non è raccomandata di routine. Il follow-up eseguito nei pazienti con tumore del **Retto** è analogo a quello dei pazienti con tumore localizzato al Colon.

Si ritiene necessaria una piccola digressione sul **CEA** nel follow-up dell'adenocarcinoma del Colon-Retto.

Le prime evidenze che hanno sottolineato l'importanza dell'associazione tra tumore del Colon-Retto ed Antigene Carcino-Embrionario (CEA) risalgono al 1965 quando Gold e Freedman<sup>1</sup> usarono una tecnica di tolleranza immunologica e di assorbimento nei tessuti tumorali di colon.

Il CEA è una glicoproteina intracellulare che non viene normalmente espressa nel tessuto intestinale sano, il CEA è riscontrato mediante RIA (Radio Immuno Assay) nel siero. Nei pazienti sani la concentrazione di CEA è normalmente molto bassa, ma nei soggetti con tumori epiteliali la sua concentrazione è molto più alta (83). La concentrazione fisiologica di CEA nel siero non supera i 5ng/ml, livelli più elevati di CEA si riscontrano nei fumatori, nei soggetti con malattie infiammatorie croniche intestinali, ma questi non superano i 10ng/ml .

Ad oggi il CEA è l'unico marcatore molecolare approvato dalle linee guida ASCO (American Society of Clinical Oncology) e dalle EGTM (European Group on Tumour Markers) per il management del tumore del colon retto.

Le linee guida ASCO (84) e le linee guida EGTM (85) hanno affermato che il CEA non è affidabile come esame di screening: i livelli di CEA possono essere aumentati nei pazienti fumatori, nelle donne, in concomitanza di cirrosi epatica e di pancreatite, in associazione ad ulcera peptica e a RCU.

Alcuni studi hanno proposto l'utilizzo del CEA nella pianificazione del trattamento dei pazienti con tumore del colon-retto, tuttavia nonostante i valori elevati di CEA siano correlati con una prognosi peggiore i dati sono ad oggi insufficienti per autorizzare l'uso della chemioterapia adiuvante con la sola indicazione data dal valore del CEA. Esso non è pertanto un marcatore con una specificità tale da consentire il trattamento basandosi esclusivamente sul riscontro di un valore al di sopra del range fisiologico.

Nella sorveglianza postoperatoria il livello di CEA plasmatico dovrebbe essere dosato una volta ogni tre mesi ed un livello elevato deve essere confermato da un secondo dosaggio.

Il dosaggio del CEA nel monitoraggio della risposta alla terapia è l'esame di scelta. Il dosaggio dovrebbe essere effettuato in concomitanza dell'inizio del trattamento quindi poi ogni tre mesi. Valori persistentemente elevati nonostante esami radiografici negativi permettono una re-stadiazione del tumore suggerendo una malattia avanzata. Un aumento dei valori di CEA tra la IV e la VI settimana dall'inizio di una nuova terapia potrebbe non essere attendibile in quanto la chemioterapia determina un aumento della sua concentrazione sierica.

Circa il 25% dei pazienti con tumore del Colon sviluppa metastasi epatiche per le quali l'unica possibilità terapeutica è la resezione chirurgica<sup>2</sup> in associazione ad altre tecniche di radiologia interventistica; la resezione epatica curativa è possibile però solo in meno del 25% di questi pazienti e la sopravvivenza a 5 anni per i pazienti operati è del 30% (86). Proprio per questi pazienti il riscontro di elevati livelli di CEA può contribuire ad una prognosi più precoce ed aumentare l'intervallo in cui si può intervenire chirurgicamente.

### **Neoplasie del Pancreas:**

I pazienti con carcinoma del pancreas radicalmente resecato dovrebbero essere sottoposti a controllo clinico dopo 3 mesi ogni 3-4 mesi per i primi due anni quindi annualmente. Una TAC spirale torace-addome-pelvi o RMN dovrebbe essere effettuata ogni 6 mesi per i primi 2-3 anni quindi annualmente. E' utile inserire controlli legati agli esiti dell'intervento ad esempio funzionalità epato-biliare emocromo rappresentando questi gli stessi esami che vengono valutati per la chemioterapia adiuvante. Un' indicazione nel follow-up trova la PET in particolare nei casi in cui vi sia il sospetto di ripresa di malattia a fronte di una TAC/RMN negative o dubbie per esiti cicatriziali legati all' intervento chirurgico. L'impiego della scintigrafia ossea è riservato ai casi in cui vi sia il sospetto di secondarismi ossei. L'unico marcatore molecolare oggi utilizzato nelle neoplasie pancreatiche è il Ca 19.9 che rappresenta infatti il marcatore tumorale di maggiore ausilio nella diagnosi di carcinoma del pancreas e che risulta positivo nell' 80% dei casi di malattia avanzata. Il Ca 19.9 potrebbe risultare falsamente positivo nei casi di ostruzione biliare sia benigna che maligna. I dati circa il valore predittivo del marcatore in pazienti con malattia avanzata sono discordanti mentre sembra avere valore come marcatore pronostico, poiché bassi livelli ematici del Ca 19.9 nel post- operatorio o un decremento dello stesso influenza positivamente la sopravvivenza. In uno studio prospettico di pazienti sottoposti a chirurgia con intento curativo la sopravvivenza mediana dei soggetti con Ca 19.9 < 180 U/ml post-chirurgia era significativamente più elevata rispetto alla popolazione rimanente (HR = 3.53; p < 0.0001). Pertanto si raccomanda il dosaggio del Ca 19.9 prima della chirurgia (se i livelli di bilirubina sono nella norma), del trattamento adiuvante e nel follow up (Linee Guida AIOM 2013).

### **1.4 Biomarcatori in Oncologia**

Le numerose evidenze a favore della presenza di malattia diffusa già negli stadi più precoci del cancro e la necessità di una diagnosi di malattia micrometastatica ha spinto verso la ricerca di un marcatore semplice da utilizzare in grado di diagnosticare la presenza di cellule in siti distanti dal primitivo.

La ricerca di questi marcatori si è evoluta di pari passo con le scoperte fatte nella patogenesi del tumore. In prima istanza sono state utilizzate metodiche atte a identificare cellule non idonee a quel particolare tessuto quindi con caratteristiche cellulari tessuto-specifiche: è il caso del CEA, delle Citocheratine che sono specifiche per il tessuto epiteliale e per questo permettono di identificare cellule nell'ambito di un contesto istologico estraneo (linfonodi); in seguito all'evidenza dell'ipotesi del tumore come malattia genetica sono stati ipotizzati marcatori genetici mutazione-specifica. Oggi il più moderno modello epigenetico di cancerogenesi ha fatto sì che si stiano mettendo a punto tecniche di identificazione delle alterazioni epigenetiche. Queste metodiche sembrano abbastanza promettenti e stanno dando risultati molto interessanti in quanto direttamente correlati ad una specificità tumorale.

#### ***1.4.1 Definizione di Biomarcatore***

Si definisce bio-marcatore (87) una bio-molecola (proteina, RNA, DNA) che correla con un dato clinico; esso può essere o una molecola secreta dal tumore o una molecola prodotta dall'organismo come risposta alla presenza del tumor (88). La stragrande maggioranza dei biomarcatori sono proteine e peptidi che vengono utilizzati come end-points per lo sviluppo di farmaci. I biomarcatori attualmente impiegati nella diagnostica molecolare sono pochi e vengono utilizzati soprattutto per migliorare il follow-up dei pazienti. Spesso tali marcatori mancano di un'adeguata sensibilità e specificità, ragion per cui non possono essere utilizzati per diagnosi precoce di tumore (89).

L'introduzione di nuovi approcci molecolari nell'ambito della diagnostica oncologica come la spettrometria di massa, i microarray di mutazione e di espressione, ha permesso simultaneamente l'analisi di migliaia di geni o proteine. La possibilità di applicare queste tecnologie all'analisi di marcatori molecolari su campioni biologici di pazienti ha così permesso di mettere a punto dei trials clinici diagnostici per la definizione di nuovi biomarcatori. L'impiego di tecniche di diagnosi molecolare applicate alla genomica può apportare vantaggi sotto diversi profili della malattia che non si limitano solo all'aspetto strettamente diagnostico.

*Diagnosi:* l'identificazione di un marcatore molecolare, può permettere una diagnosi precoce della malattia. In alcuni casi si possono ottenere informazioni sul tipo di



tumore. Inoltre la diagnostica molecolare può sostituire tecniche invasive come endoscopie e biopsie ripetute migliorando la compliance del paziente.

*Eziologia:* il marcatore molecolare può costituire esso stesso un fattore eziologico della malattia, soprattutto nel caso di neoplasie eredo-familiari.

*Prognosi:* il marcatore molecolare può essere impiegato come end-point fornendo maggiori informazioni sulla prognosi.

*Follow-up:* l'identificazione di marcatori clonali permette di distinguere cellule normali da cellule tumorali occulte, questo si traduce in una maggiore sensibilità nella ricerca dell'eventuale malattia minima residua.

*Terapia:* l'individuazione di un particolare marker molecolare può migliorare la predizione della risposta ad un determinato trattamento, può inoltre fornire informazioni utili per identificare target terapeutici, al fine di sviluppare nuovi farmaci in grado di inibire specifici pathways coinvolti nel processo di carcinogenesi. La validazione di un biomarcatore dipende da diversi fattori.

Possibili fonti di variabilità nella misurazione: intervalli di confidenza, numero di pazienti per ogni misurazione e combinazione della variabilità biologica e analitica.

Fattori da considerare durante la pianificazione del processo di validazione: il fine dello studio del biomarcatore, selezione dei pazienti, trattamenti terapeutici, raccolta e processamento dei campioni, validazione bioanalitica, regolamenti e requisiti minimi.

Fasi della validazione:

1. definizione dell'applicazione del biomarcatore
2. specificazione del saggio da impiegare
3. disegno del metodo
4. validazione del saggio
5. sviluppo del metodo
6. autorizzazione del saggio
7. inizio del trial clinico

Il trial clinico diagnostico prevede lo sviluppo di un network fra ricercatori, clinici, epidemiologi, biostatistici, tecnici e diverse altre figure professionali. L'obiettivo comune è il trasferimento di un biomarcatore da un ambito di identificazione e caratterizzazione ad un contesto di applicazione clinica.

Affinché un biomarcatore proteico o genomico, possa essere impiegato in ambito diagnostico è necessario che segua un particolare iter di sviluppo. Il “*Early Detection Research Network*” (EDRN) (90), è l'organo del *National Cancer Institute* che controlla lo sviluppo dei biomarcatori e delle tecnologie associate per la diagnostica molecolare delle neoplasie. Sulla base dei risultati raggiunti dall'EDRN è stato formulato un modello a 5 fasi (91) per lo sviluppo di un biomarcatore per la diagnosi precoce di cancro:

1. *Fase preclinica*: è la fase di laboratorio in cui vengono identificati i potenziali biomarcatori su modelli animali o su linee cellulari. In questa fase in passato si utilizzavano spesso il western blot e l'immunoistochimica. Le tecniche più recenti comprendono microarrays e spettrometria di massa. Gli obiettivi di questa fase sono studi di espressione genica o studi di proteomica per identificare geni o cluster di geni che sembrano essere overespressi o ipoexpressi nel tessuto tumorale rispetto al tessuto controllo. Il tessuto di un organo, in genere, non viene usato per uno screening perché sarebbe troppo invasivo. Questo ha favorito lo sviluppo di saggi clinici basati sui livelli sierici di proteine con funzione di marcatori o sul livello di anticorpi sierici diretti contro tali proteine.

2. *Saggi clinici e validazione*: studi che determinano la capacità di un biomarcatore di distinguere un soggetto affetto da malattia neoplastica rispetto ad un soggetto sano. In questa fase si conferma la relazione univoca fra riscontro del biomarcatore e malattia concomitante. Questa fase però non determina se la malattia può essere individuata precocemente utilizzando il biomarcatore oggetto di studio.

3. *Fase retrospettiva longitudinale*: determina la capacità dei biomarcatori di identificare la malattia nello stadio preclinico testando i marcatori su tessuti ottenuti longitudinalmente da vari gruppi di ricerca. Vengono raccolti i campioni biologici di pazienti oncologici relativi a fasi precedenti alla diagnosi clinica. Questi campioni vengono confrontati con soggetti controllo (soggetti che non hanno sviluppato cancro): se i livelli del biomarcatore nei soggetti che svilupperanno la malattia deviano appena dai livelli standard misurati nei soggetti controllo e se questa deviazione si verifica proprio in fasi temporalmente vicine alla diagnosi, il biomarker potrebbe essere utilizzato per uno screening. Se i livelli del biomarcatore sono diversi rispetto al controllo mesi o anni prima che si manifestino i sintomi della malattia,

aumenta la possibilità di utilizzarlo per una diagnosi precoce della malattia. In questa fase vengono quindi definiti i criteri di positività per uno screening prospettico.

4. *Screening prospettico*: identifica l'estensione e le caratteristiche della malattia identificate dal test e verifica la presenza di falsi positivi. Gli studi di fase 1, 2 e 3 sono retrospettivi, cioè si basano su analisi di campioni archiviati, gli studi di fase 4 sono prospettivi, cioè coinvolgono coorti di soggetti malati e soggetti controllo nel presente per poter definire il ruolo del biomarcatore nelle procedure diagnostiche. poiché la prevalenza della malattia in uno studio di coorte è comunque bassa, sono necessarie coorti di grandi dimensioni.

5. *Fase di controllo*: valuta contemporaneamente il ruolo del biomarcatore nella detection del cancro e l'impatto generale dello screening mediante studi di popolazione su larga scala. Nonostante sia stato stabilito nelle fasi precedenti la capacità del biomarcatore di individuare precocemente la malattia, ci possono essere altre cause per le quali il biomarcatore non può conferire un beneficio in uno screening su popolazione:

- a. trattamento inefficace per il tipo di tumore su cui si effettua lo screening;
- b. bassa compliance del programma di screening o difficoltà nell'implementare il programma nella pratica comune;
- c. costi di screening proibitivi o correlati alla morbilità;
- d. over-diagnosi di tumori che, in assenza di un programma di screening, non verrebbero individuati e potrebbero regredire in alcuni casi.

#### ***1.4.2 Marcatori Biologici Aspecifici***

La metodica che è stata maggiormente utilizzata ad oggi per la diagnosi di malattia diffusa e per la scoperta di micrometastasi è l'Immunoistochimica (IHC). L'IHC è una tecnica che si avvale di una reazione antigene – anticorpo, l'anticorpo si lega alla proteina che renderà visibile mediante una colorazione basata su un meccanismo enzimatico o mediante fluorescenza o mediante un segnale radioattivo. L' IHC permette di colorare e di rendere visibili molecole che altrimenti non verrebbero visualizzate con una normale colorazione H&E .

Nel tumore del Colon – Retto l'IHC è stata ampiamente utilizzata per identificare cellule neoplastiche nei linfonodi o in altri tessuti. Gli antigeni maggiormente utilizzati per la colorazione IHC possono essere principalmente le citocheratine (AE1/AE3/AE4 CK19, CK8/18, CK49), o il CEA (92).

Nel carcinoma del Pancreas invece si rende necessario l'utilizzo di marcatori immunoistochimici per definire la linea differenziativa della neoplasia. E' caratteristica della differenziazione duttale la produzione di muco che si riflette con la positività per l'antigene MUC 1, la differenziazione acinare si riconosce dalla produzione di andina frizzina chimotripsina e lipasi la differenziazione acinare si riconosce invece dalla produzione di enzimi come tripsina, chimotripsina e lipasi mentre la linea neuroendocrino presenta come cromogranina e sinaptofisina.

La positività alla colorazione IHC per le citocheratine o per il CEA correla con una diminuzione dell' Overall Survival (93). Le citocheratine sono proteine *tessuto-specifiche*. Il pattern di espressione delle citocheratine dipende strettamente dal tipo di epitelio, dal grado di differenziazione della cellula e dallo stadio di sviluppo. Le citocheratine sono infatti in grado di identificare i diversi tipi di epitelii a seconda del loro profilo di espressione. Questa proprietà viene mantenuta dalle cellule neoplastiche e per questa ragione il profilo di espressione delle citocheratine tende a mantenersi costante nonostante l'epitelio si avvii verso la trasformazione neoplastica. Questo motiva l'utilizzo della colorazione IHC per le citocheratine come marcatori di malattia disseminata, l'aspecificità di questa metodica è tuttavia data dal fatto che le citocheratine sono molecole espresse normalmente anche dall'epitelio sano, esse formano infatti i filamenti intermedi del citoscheletro; la positività alle citocheratine potrebbe rappresentare un falso positivo dovuto alla presenza di cellule tumorali sane. Le stesse proteine possono essere identificate mediante la ricerca dell'espressione di mRNA trascritto dai geni delle medesime proteine. L'ipotesi di utilizzo di RNA per la ricerca di cellule tumorali occulte deriva dall'osservazione che la presenza di queste molecole permettere in modo indiretto di identificare le cellule che la trascrivono, inoltre, grazie alle nuove metodiche di RT-PCR non solo è possibile amplificare l'mRNA relativo alla molecola proteica ma anche quantizzarla.

Liefers GJ in un lavoro pubblicato nel 1998 dal New England Journal of Medicine<sup>3</sup> ha utilizzato il CEA, normalmente non espresso dal tessuto sano, come marcatore di

malattia. Liefers ha valutato mediante la misurazione di mRNA l'espressione di CEA. L'RNA era stato isolato da linfonodi asportati ed immediatamente congelati a -80°C. Dai risultati a cui giunge si evince che il riscontro di micrometastasi mediante RT-PCR in linfonodi di pazienti allo stadio II in cui l'esame istologico classico con colorazione H&E era negativo può avere una validità clinica notevole. I risultati ottenuti sono sorprendenti infatti la sopravvivenza dei pazienti scende dal 93% nei pazienti con negatività al marcatore molecolare al 61% in quelli in cui l'mRNA era positivo. Lavori più recenti hanno portato agli stessi risultati.

Due recenti metanalisi **Errore. Il segnalibro non è definito. Errore. Il segnalibro non è definito.** hanno posto a confronto studi che utilizzavano come metodica di identificazione delle micrometastasi colorazioni IHC e RT-PCR. Entrambi gli studi hanno sottolineato l'importanza prognostica della malattia metastatica occulta. La metodica di colorazione IHC è tuttavia poco specifica: le cellule identificate mediante IHC potrebbero non rappresentare cellule tumorali bensì cellule mesoteliali iperplastiche o cellule epiteliali benigne o anche cellule giunte in loco durante la manipolazione chirurgica.

Allo stesso tempo le metodiche di identificazione delle cellule tumorali occulte mediante RT-PCR seppure abbastanza specifica è gravata da difficoltà tecniche notevoli. L'RNA è una molecola estremamente delicata, il tessuto dal quale viene estratto deve essere congelato a -80°C, i kit di estrazione del materiale nucleico richiedono un'attenzione ed una dedizione particolare a causa della fragilità della molecola. A queste problematiche di natura prevalentemente tecnica si aggiunge la difficoltà data dal fatto che questi linfonodi devono essere sottratti all'analisi convenzionale con H&E.

Le due metodiche appaiono pertanto non esaustive e sicuramente lasciano aperta la necessità di una metodica più semplice da poter essere utilizzata come marcatore.

In base a questa necessità numerosi studi stanno utilizzando alterazioni tumorali specifiche presenti nel DNA in quanto esso è una molecola molto stabile, e può essere estratto sia dal tessuto tumorale fresco che dal tessuto incluso in paraffina diminuendo i rischi di perdere il campione a causa di una cattiva conservazione del campione; le mutazioni genomiche costituiscono inoltre un'alterazione tumore-specifica aumentando la sensibilità dell'analisi.

## **1.5 Dal Modello Classico di cancerogenesi genetica alla identificazione di marcatori di mutazione**

Negli ultimi 15 anni si è dimostrato che il tumore del colon-retto è una malattia progressiva e multistep, gli studi epidemiologici hanno comunque dimostrato come ci siano numerosi fattori ambientali che contribuiscano all'insorgenza dello stesso. Circa il 5% (94) dei tumori del colon sono causati da una sindrome monogenica: la poliposi adenomatosa familiare (FAP) o la sindrome di Lynch conosciuta anche come tumore del colon retto ereditario non poliposico (HNCPP). La FAP è causata da una mutazione germinale del gene oncosoppressore APC. Mutazioni di questo gene sono state osservate in circa l'85-90% dei tumori del colon familiari e sporadici. Questa mutazione ha una penetranza pari a circa il 100% ed è caratterizzata dallo sviluppo di centinaia di migliaia di polipi adenomatosi nel grosso intestino durante la seconda e terza decade di vita. Questi polipi inizialmente benigni accumulano progressivamente mutazioni che conducono verso la conversione da lesioni benigne in maligne. Tali pazienti possono essere inoltre caratterizzati da altre lesioni extraintestinali come alterazioni retiniche, osteomi, ampullomi, tumori desmoidi o tumori cerebrali. Una seconda sindrome familiare legata all'insorgenza del tumore del Colon – Retto è l'HNCPP o sindrome di Lynch. Essa è causata da una mutazione nei DNA mismatch-repair (hMLH1 e hMSH2), è un disordine autosomico dominante caratterizzato clinicamente da un'insorgenza rapida di tumore del colon non preceduta da una poliposi adenomatosa e di altri tumori extraintestinali (endometrio, ovaio, stomaco, tratto urinario, pancreas, piccolo intestino e encefalo). La maggior parte di questi tumori insorge nel colon ascendente ed ha un picco di incidenza intorno ai 40 anni. La diagnosi di sindrome di Lynch è suggerita dalla presenza di tumori sincroni e metacroni. Questi tumori sono inoltre caratterizzati dalla presenza di alcune caratteristiche patologiche come l'infiltrazione linfocitaria, il carattere mucinoso, e la scarsa differenziazione.

Il tumore del colon non ereditario ha un picco di incidenza compreso tra i 60 ed i 90 anni. Numerosi dati clinici ed istopatologici hanno suggerito che il tumore del Colon – Retto derivi da tumori preesistenti benigni (adenomi).

La teoria di sviluppo del tumore più accreditata fino al 1990 prevedeva che il tumore avesse un'origine monoclonale questo si è dedotto in seguito all'osservazione che anche piccoli adenomi hanno un'origine monoclonale a differenza della mucosa colica sana che ha invece una componente policlonale. Da ciò si è dedotto che il processo di cancerogenesi derivi da una o da un ristretto gruppo di cellule che a causa di mutazioni monoclonali devono ricevere un vantaggio selettivo di crescita. Le alterazioni geniche presenti nel contesto delle cellule tumorali sono diverse: le mutazioni del gene RAS sono le più frequenti e sono presenti circa nel 50% delle cellule tumorali ed in una simile percentuale negli adenomi (95).

La perdita di materiale genico in regioni di cromosomi si verifica spesso nel tumore del Colon - Retto solitamente questa coinvolge solo uno dei due cromosomi parentali presenti nelle cellule normali.

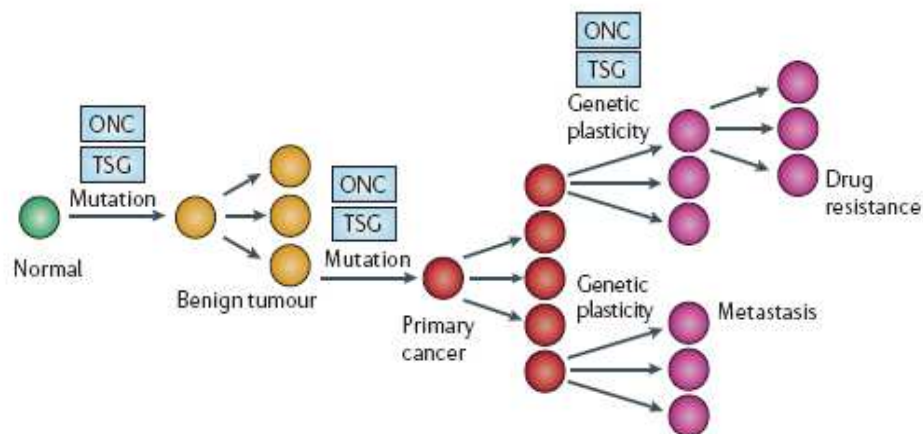
L'alterazione genetica che si riscontra nella maggior parte dei casi è costituita dalla perdita di un'ampia porzione del cromosoma 17p. Questa alterazione si verifica in più del 75% dei tumori ed è associata ad una progressione adenoma – tumore.

La perdita allelica di una regione del cromosoma 18q rappresenta la seconda alterazione genica in ordine di frequenza nel tumore del Colon – Retto ed è presente nel 70% dei tumori e nel 50% degli adenomi il gene codificato da questa regione è chiamato DCC (Deleted in Colon Cancer). Questo gene è normalmente espresso dalla mucosa del colon sana, ma la sua espressione è alterata nella maggior parte delle cellule del tumore maligno ma in una percentuale minore di cellule dell'adenoma. Le alterazioni di DCC determinano alterazioni delle normali interazioni cellula-cellula e cellula matrice.

Il tumore del Colon – Retto attraverso un processo che prevede un'alterazione che va da adenoma ad adenoma displastico a tumore in un lasso di tempo misurato in decenni va da un'alterazione di tipo iperplastico ad una tipologia cellulare con capacità metastatiche. La cancerogenesi è caratterizzata da un ampio spettro di alterazioni genetiche che si verificano in fasi caratteristiche della progressione tumorale, tuttavia è l'accumularsi di alterazioni piuttosto che l'ordine in cui avvengono ad essere determinante per la trasformazione tumorale. Le alterazioni che si verificano nella cellula neoplastica possono essere molto varie: alcune determinano l'acquisizione di capacità come quella di essere “auto-sufficienti per i segnali di crescita” o di essere

“insensibili ai segnali di arresto della crescita”, o di meccanismi capaci di “evadere l’apoptosi” (tra questi meccanismi rivestono un ruolo fondamentale le alterazioni che coinvolgono i mitocondri), o di acquisire una “capacità replicativa illimitata”, o di acquisire la “capacità di sostenere l’angiogenesi” e quindi alla fine di “invadere i tessuti circostanti e di metastatizzare” (96).

Fearon e Vogelstein erano giunti alla conclusione che affinché si abbia il tumore debbano verificarsi almeno tre steps: Iniziazione, Promozione e Progressione. Il processo di cancerogenesi può essere studiato negli umani solo indirettamente. Il modello multistep di cancerogenesi proposto da Vogelstein è stato ampiamente utilizzato lasciando tuttavia molte domande senza una risposta. Innanzitutto a causa del fatto che non si conosce tutto sulla funzione dei geni alterati osservati e proposti nel modello, la conoscenza delle esatte funzioni di quei geni è necessaria per la comprensione degli effetti fisiologici e biochimici della mutazione (Figura 1). Il numero esatto delle mutazione necessarie per promuovere la cancerogenesi non è nota ed il numero di mutazioni necessario per arrivare al tumore potrebbe essere differente nei diversi membri della popolazione. Non si sa inoltre se la maggior parte dei tumori si verifichi in soggetti geneticamente predisposti.



**Figura 1.** Modello di Cancerogenesi classica (modificata da Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. *The epigenetic progenitor origin of human cancer*. Nat Rev Genet. 2006 Jan;7(1):21-33)



Ci si chiede se ci possano essere altre alterazioni in quei casi di tumore in cui manca una alterazione di p53 o di DCC, o quale sia la relazione tra fattori ambientali statisticamente correlati con l'insorgenza del tumore del colon e alterazioni genetiche, quale possa essere quindi la correlazione tra geni e ambiente e dove si possano collocare i fattori ambientali nel processo multistep.

Da questo modello viene fuori un interrogativo molto importante da un punto di vista terapeutico: ci si chiede infatti se queste alterazioni genetiche possano essere "inesorabili" o arrestate in qualche modo prima di giungere ad un intervento chirurgico aggressivo e comunque altamente mutilante.

Il modello multistep di Vogelstein, seppure oggi superato, ha determinato una rivoluzione nel campo dell'oncologia molecolare. Egli infatti è arrivato alla conclusione che le alterazioni genetiche debbano essere presenti anche nelle fasi più precoci di cancerogenesi, il riscontro di mutazioni significativamente predittive di cancerogenesi in materiale rinvenuto nelle feci o nel sangue potrebbe essere importante anche per una diagnosi precoce di malattia o follow-up o per una terapia tumore-specifica come accade ad esempio con i farmaci biologici in cui solitamente un'immunoglobulina o una proteina di fusione legandosi con una proteina tumore-specifica ne determina l'inattivazione: è il caso dell'Imatinib® nella Leucemia Mielode Cronica cromosoma Philadelphia +; alcuni esempi nel tumore del colon potrebbero essere il Bevacizumab® un anticorpo monoclonale diretto contro il VEGF (97) o il Cetiximab® ed il Panitumumab® diretti contro l'EGFR. Vari studi nell'ambito della genetica molecolare hanno permesso di individuare nuovi target genici che potrebbero essere impiegati come markers tumorali. Il modello multi-step di Vogelstein ha stabilito una correlazione fra alterazioni molecolari e fase di sviluppo della lesione neoplastica, per tale ragione ha senso parlare di marker genetici applicati alla diagnosi precoce dei tumori. Attualmente i test genetici in oncologia vengono effettuati solo per la valutazione della suscettibilità all'insorgenza di tumori eredo-familiari in soggetti a rischio.

Il modello "Multistep" seppure abbia mantenuto la sua veridicità nell'ambito della cancerogenesi è stato soggetto ad una ri-definizione: le mutazioni genetiche non sono l'unico meccanismo attraverso cui si può ottenere un'alterazione dell'espressione

genica, le alterazioni epigenetiche rappresentano sicuramente un meccanismo molto più ampio e sicuramente più frequente nella determinazione del cancro. Le alterazioni epigenetiche sono sicuramente più frequenti e grazie alla loro complessità completano il modello che era stato proposto nel 1990 da Vogelstein (95).

### ***1.5.1 Marcatori Genetici***

I marcatori genetici classici hanno proposto l'utilizzo di mutazioni su oncogeni, su geni oncosoppressori e su geni coinvolti nel meccanismo di riparazione del DNA per la valutazione diagnostica, prognostica e terapeutica del tumore del Colon – Retto.

Già Vogelstein aveva sottolineato l'importanza delle alterazioni genetiche nel tumore del Colon – Retto come un possibile marker utile nella diagnosi, nella terapia e nella valutazione prognostica (98).

Ad oggi sono stati proposti moltissimi markers genetici nel management del tumore del Colon retto. I markers genetici appaiono abbastanza utili in quanto permettono di identificare alterazioni “patogenetiche” del cancro permettendo talvolta di individuare alterazioni estremamente precoci e specifiche.

Nel 2007 sono state pubblicate le linee guida europee e nel 2006 le linee guida ASCO per l'utilizzo clinico dei markers tumorali. La possibilità di isolare molecole di DNA dal sangue, dal tessuto, ma ancora più semplicemente dalle feci permette di valutare come una metodica semplice, poco invasiva ed abbastanza predittiva permetta di pianificare il trattamento o di predire l'outcome in pazienti oncologici.

I markers genetici permettono inoltre di valutare la presenza di una mutazione che è tumorale. La specificità di identificare cellule tumorali e quindi nella ricerca di Malattia Minima Residua aumenta sicuramente a differenza dei marcatori proteici che seppure presentino una sensibilità accettabile, sono molto poco specifici in quanto tessuto- specifici e non tumore specifici.

I markers genetici ad oggi studiati nel tumore del Colon – Retto comprendono un ampio range di target: alcuni sono stati valutati prevalentemente come markers prognostici altri con un risvolto prevalentemente terapeutico.

Uno dei geni più studiati ed utilizzati come marker di malattia neoplastica è il gene **APC**. L'analisi mutazionale per questo gene è oggi eseguita di routine per la diagnosi di FAP (99). Il ruolo della correlazione tra alterazione genetica e insorgenza di cancro

è stata compresa da tempo, infatti circa il 70% dei pazienti con tumore del colon sporadico presentano una mutazione di APC (100), le alterazioni di questo gene sono inoltre presenti sin dagli stadi più precoci della malattia. Uno degli effetti più importanti della mutazione su APC è data dall'iperattivazione del pathway di Wntless/Wnt: ciò determina l'espressione di geni che promuovono la crescita cellulare attraverso la perdita del controllo e del legame con la  $\beta$ -catenina.

La  **$\beta$ -catenina** svolge un ruolo molto importante nella cancerogenesi del tumore del Colon-Retto ma anche di altri tumori (melanoma e adenocarcinoma dello stomaco). Mutazioni del gene che codifica per la  $\beta$ -catenina che la rendano incapace di legarsi al complesso APC determinano l'attivazione delle funzioni oncogeniche ossia l'attivazione di c-myc, della ciclina-2 ed altri geni che stimolano la proliferazione cellulare e determinano la progressione neoplastica<sup>4</sup>. Anche le mutazioni sul gene della  $\beta$ -catenina sono state utilizzate come marker diagnostico/prognostico nel tumore del Colon – Retto.

Le linee guida EGTM ed ASCO considerano ad oggi questi markers nel management diagnostico e prognostico del carcinoma del Colon – Retto:

- **RAS**. Questo oncogene è stato ampiamente utilizzato, codifica per una proteina ad attività GTPasica, è attivato in risposta ad ormoni, fattori di crescita, citochine ed è efficace per il controllo del ciclo cellulare. L'iperespressione di questo gene è stata una delle prime evidenziate nella cancerogenesi del tumore del colon. L'importanza di Ras e della via da esso controllata è così importante nella cancerogenesi del Colon-Retto che Engeland vM in un lavoro pubblicato nel 2002 (101) ha dimostrato come non solo un'iperattivazione dell'oncogene Ras, ma anche l'inattivazione di un suo bersaglio, *RASSF1A*, sia coinvolta nel meccanismo multifasico. Le linee guida ASCO 2006 affermano tuttavia che non ci sono ad oggi dati sufficienti per consentire l'uso di Ras come marcatore per screening, staging, sorveglianza e monitoraggio.

- **TP53**. *p53* rappresenta il punto di confluenza di un complesso network di pathways fondamentali per la regolazione della crescita cellulare e per l'apoptosi indotta da stress genotossico o non-genotossico (102). Si possono distinguere fondamentalmente tre pathways che attivano *p53*: danno al DNA: può essere causato da agenti fisici come le radiazioni ionizzanti e portano all'attivazione di due protein-kinasi: ATM e Chk2 che fosforilano *p53* inibendo il legame a MDM2 alterazione dei segnali di crescita cellulare: l'overespressione di oncogeni come Ras o Myc porta all'attivazione della trascrizione di  $p14^{ARF}$  che a sua volta lega ed inibisce MDM2 (103). Questo pathway può essere indotto da chemioterapici, raggi UV ed inibitori di proteinchinasi e porta all'attivazione di ATR e caseina kinasi II che fosforilano *p53* inibendo il legame a MDM2. La perdita biallelica di questo gene determina una incapacità da parte delle cellule di andare incontro ad apoptosi con l'accumulo di cellule alterate rese immortali. La mutazione di questo gene è una delle più frequenti riscontrate nei tumori solidi. L'utilizzo di TP53 come marcatore tumorale è stato proposto anche per tumori di altri distretti: Poeta ML et al. hanno proposto l'utilizzo di un marcatore basato su una mutazione di TP53 (104) in pazienti con tumori localizzati al distretto testa collo in seguito all'evidenza di una correlazione tra prognosi e mutazione. I pazienti che subivano un intervento chirurgico con intento radicale ma con mutazione di TP53 erano maggiormente a rischio di sviluppare recidiva e quindi aumentava il rate di mortalità. Nel tumore del Colon c'è un'ampia letteratura riguardante le alterazioni di TP53 che effettivamente è associato ad una prognosi peggiore qualora mutato. Le linee guida ASCO nonostante sia presente un'ampia letteratura a riguardo di TP53 come marker per il tumore del Colon affermano che a causa delle discrepanza dei diversi dati questi non può essere proposto nella pratica clinica.
- **DCC**. *Deleted in Colon Cancer* è un gene oncosoppressore localizzato nel braccio lungo del cromosoma 18 (18q). Esso è implicato nei meccanismi di adesione cellulare. Una delezione di questo gene era stata evidenziata

già da Vogelstein. La delezione avviene nei più precoci stadi di sviluppo ed è legata ad una prognosi peggiore nel tumore del Colon allo stadio II. Seppure la delezione rappresenti un'alterazione frequente DCC è spesso coinvolto nel fenomeno del LOI (*Loss Of Imprinting*). Nello stesso cromosoma sono localizzati altri due geni implicati nei meccanismi di cancerogenesi DPC4 e blc-2. Le linee guida ASCO non raccomandano l'utilizzo di DCC né come marcatore di screening né come marcatore di risposta alla terapia né come marcatore prognostico.

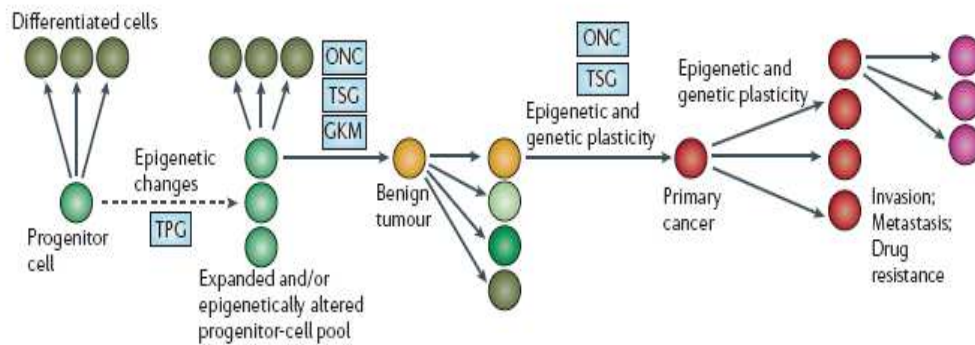
- **Instabilità dei microsatelliti (MCI)**. L'instabilità dei microsatelliti si verifica quando c'è una mutazione od una inattivazione dei mismatch repair genes che sono alla base dei meccanismi di riparo degli errori che si verificano durante la fase di sintesi del DNA. Questa alterazione molecolare è stata osservata in circa il 15-20% dei tumori del colon sporadici (105), mentre è considerata un'alterazione genetica alla base della sindrome HNPCC. Sono stati identificati almeno 5 geni "mismatch repair" MLH1, MSH1, MSH3, PMS1 ed MLH6. La MCI può essere riportata usando dei semplici metodi di amplificazione PCR di cinque regioni microsatelliti. La presenza di MCI in più di una di queste regioni determina il fenotipo MCI-High (MCI-H), la presenza di una singola alterazione di un solo microsatellite determina il fenotipo MCI-Low (MCI-L), qualora non ci sia nessun tipo di MCI il tumore è considerato MCI-Stable (MCI-S). La presenza di un fenotipo MCI-L si è visto correlare con una prognosi migliore e con una migliore risposta alla chemioterapia neoadiuvante. Sebbene ci siano ormai numerose osservazioni che confermano l'importanza della MCI, le linee guida ASCO ad oggi non ne raccomandano l'utilizzo come marcatore prognostico né per predire l'efficacia della chemioterapia adiuvante con Fluorouracile nel tumore del Colon sporadico. L'utilizzo delle mutazioni sui mismatch repair genes (MSH2, MLH1, MSH6 e PMS2) viene utilizzato ormai di routine come marcatore diagnostico nella sindrome di Lynch.

## **1.6 Dal Modello Integrato di Cancerogenesi Epigenetica Staminale all'identificazione di Nuovi Marcatori Tumore-Specifici**

Il modello di cancerogenesi è stato ampiamente modificato nel corso del tempo. Il modello multistep di Vogelstein ipotizzava che il tumore progredisce da una forma relativamente ben differenziata e non particolarmente aggressiva determinata da una o poche mutazioni genetiche verso una forma di tumore man mano più aggressivo, a causa della sommatoria di un numero maggiore di alterazioni genetiche. Molti progressi sono stati fatti negli ultimi 25 anni sulla comprensione delle alterazioni epigenetiche nel cancro: l'ipometilazione dell'intero genoma era stata già evidenziata da Vogelstein nel 1983 (106) insieme all'ipoacetilazione delle proteine istoniche ed all'ipermetilazione o ipometilazione gene-specifica.

Il modello integrato di cancerogenesi epigenetica staminale (107) è nato dall'osservazione che le alterazioni epigenetiche nel cancro sono estremamente precoci e le cellule staminali costituiscono il compartimento da cui trae origine il cancro e poiché le differenze epigenetiche distinguono le cellule staminali dalle cellule somatiche, è probabile che l'alterazione del messaggio epigenetico nella cellula staminale possa essere alla base del patogenesi del cancro. Le alterazioni epigenetiche nei precursori cellulari pluripotenti potrebbero spiegare molte delle proprietà eterogenee che sono comunemente associate con la crescita tumorale, l'invasione dei tessuti circostanti e la resistenza alla terapia.

Le mutazioni genetiche non sono l'unica via delle alterazioni di espressione che si verificano nel cancro. Le alterazioni epigenetiche patologiche ereditate dalle cellule figlie anche dopo divisione mitotica si considerano sempre più coinvolte come un'alternativa plausibile alle mutazioni ed alle alterazioni cromosomiche nelle alterazioni dell'espressione genica.



**Figura 2.** Modello Epigenetico Staminali del Cancro (modificata da Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. *The epigenetic progenitor origin of human cancer*. Nat Rev Genet. 2006 Jan;7(1):21-33)

Il modello epigenetico staminale del cancro pone alla base della patogenesi alterazioni genetiche ed epigenetiche. Le alterazioni genetiche sono comuni nei tumori, ma le alterazioni epigenetiche sono ubiquitarie e servono come surrogato per le alterazioni genetiche (attivazione di oncogeni o inattivazione di geni onco-soppressori). Le alterazioni epigenetiche come l'ipometilazione generalizzata del DNA contribuiscono all'instabilità cromosomica ed ai riarrangiamenti durante la progressione tumorale. È ormai noto che il tumore seppure costituito da un'ampia componente cellulare anche molto eterogenea derivi da un singolo clone cellulare (108), le alterazioni che determinano successivamente i cambiamenti che conferiscono al tumore questa eterogeneità sarebbero dovuti ad alterazioni genetiche che avverrebbero all'interno del clone neoplastico (Figura 2). Il fatto che le alterazioni epigenetiche siano così precoci nella cancerogenesi e perfino nel tessuto sano prima che si sviluppi il tumore indica che le alterazioni epigenetiche nelle cellule staminali potrebbero provvedere ad uniformare la patogenesi tumorale. Le alterazioni epigenetiche nei progenitori non costituiscono solo un rischio di diventare tumore, ma sono determinanti per la progressione tumorale e per l'eterogeneità cellulare del tessuto canceroso. Feinberg ritiene che il tumore si sviluppi prevalentemente in steps: alterazione epigenetica nella cellula staminale, mutazione secondaria e plasticità genetica ed epigenetica.

**Alterazioni epigenetiche nelle cellule staminali.** Il primo step ipotizzato da Feinberg è dato da un'alterazione epigenetica nelle cellule staminali di un determinato organo o sistema che conduce ad una popolazione di cellule pronte per dare neoplasia. Le evidenze a favore di questa ipotesi ad oggi sono cinque:

1. studi su cellule tumorali in vitro hanno dimostrato la reversibilità del fenotipo nello sviluppo sia di leucemia che di altri tumori solidi.
2. Le alterazioni epigenetiche precedono le mutazioni iniziali nel cancro ossia l'ipometilazione diffusa del DNA l'ipermetilazione dei promotori. I cambiamenti devono precedere le più precoci alterazioni genetiche in quanto queste sono ritrovate perfino nelle forme neoplastiche benigne.
3. Si è visto che nuclei di cellule tumorali di melanoma clonati possono differenziarsi in topi normali il che significa che la maggior parte delle proprietà delle cellule tumorali può essere riprogrammata nello sviluppo normale, da ciò si deduce che esse possano essere controllate epigeneticamente. Nello stesso tempo il fatto che il tumore non sia esclusivamente una patologia epigenetica è rivelato dal fatto che i topi clonati mostrano un'incidenza di melanoma aumentata.
4. In seguito a trapianto seriale di tessuto tumorale le cellule trapiantate possiedono un range di marcatori tumorali il che indica che una sottopopolazione di cellule tumorali possiede un meccanismo di auto-mantenimento che è simile se non identico alle cellule staminali. La resistenza all'Imatinib nella leucemia mieloide cronica potrebbe essere dovuta ad una mutazione di BCR-ABL, ma un contributo importante in questo sembra dato da un'espansione clonale delle cellule progenitrici. Il farmaco eliminerebbe le cellule leucemiche ma non elimina quella popolazione di cellule staminali che determina il tumore.
5. La perdita dell'Imprinting di IGF2 (insulin-like growth factor 2) è comune nell'epitelio del colon normale di pazienti che sono ad alto rischio di sviluppare tumore del Colon – Retto. Gli studi murini mostrano che quest'alterazione epigenetica determina un passaggio da epitelio intestinale normale verso una popolazione cellulare staminale espansa. Un'alterazione della metilazione è inoltre stata ritrovata nello stroma tumorale.



**Mutazione genetica.** Il secondo step nell'iniziazione neoplastica sarebbe dato da una mutazione genetica all'interno della popolazione cellulare "epigeneticamente" alterata. Questo evento era quello che secondo il modello classico di Vogelstein rappresentava il primo step. La mutazione iniziale è tumore specifica. Essa tuttavia può essere anche sostituita da un'alterazione epigenetica che induca un'iperespressione di un oncogene o il silenziamento di un gene oncosoppressore.

**Plasticità genetica ed epigenetica.** Il terzo step è dato dalla plasticità genetica o epigenetica. Tuttavia questa è la fase ancora meno chiara, non tanto per le alterazioni epigenetiche che effettivamente possono verificarsi continuamente, lo stesso Feinberg definiva le alterazioni epigenetiche come alterazioni scritte "a matita" a differenza delle alterazioni epigenetiche che sarebbero scritte "a penna", ma per la plasticità genetica che può essere dovuta in parte all'accorciamento dei telomeri, in parte ad un aumento delle sequenze palindromiche all'interno del genoma tumorale che determinerebbe una maggiore instabilità con la possibilità di cicli bridge-break-fusion. Il modello epigenetico staminale è estremamente interessante per la comprensione della biologia del tumore. Le alterazioni epigenetiche possono precedere di moltissimi anni l'insorgenza di tumori tanto che le alterazioni molecolari potrebbero essere riconosciute molto prima che compaiano alterazioni anatomo-patologiche. Le alterazioni epigenetiche coinvolgono inoltre un campione di cellule ampio per cui il tumore avrebbe un'origine policlonale (Figura 3) al contrario di quanto proposto nel vecchio modello. Quest'ipotesi confermerebbe la teoria tumore come "organo anormale" o "organoide" in cui sarebbero presenti non solo cellule tumorali, ma



subire alterazioni e divenire anomalo già durante lo sviluppo fetale predisponendo ai tumori pediatrici, ma può anche cambiare durante la vita adulta contribuendo al rischio di sviluppare tumori nell'età adulta. La metilazione del DNA ha un ruolo critico nel controllo dell'espressione genica e della struttura nucleare. Nell'uomo la metilazione del DNA si verifica nelle citosine che precedono le guanine in aree chiamate CpG islands. Queste regioni si trovano prevalentemente nelle estremità 5' dei cromosomi ed hanno una funzione prevalentemente di regolazione in molti geni. La metilazione del DNA è uno dei meccanismi di controllo dell'espressione genica del DNA tessuto - specifica e consente di silenziare determinati geni in modo tessuto-specifico. La metilazione è inoltre il meccanismo attraverso cui si verifica l'imprinting. Nel genoma femminile uno dei due cromosomi X risulta ipermetilato il che determina l'inattivazione di uno dei due cromosomi e previene probabilmente l'instabilità cromosomica, le traslocazioni e la frammentazione genica. La metilazione si verifica inoltre anche nella modificazione degli istoni, che non sono solo proteine con una funzione di supporto del DNA ma partecipano attivamente ai meccanismi di controllo dell'espressione genica. Le modificazioni epigenetiche che si verificano su queste proteine sono: l'acetilazione delle lisine, metilazione delle arginine e delle lisine e la fosforilazione delle serine. Queste alterazioni influenzano la trascrizione genica ed i meccanismi di riparo del DNA (110).

La prima alterazione epigenetica ad essere scoperta fu l'**ipometilazione globale del DNA**. Questa alterazione si trova fin dagli stadi più precoci di cancerogenesi ed è presente anche nei tumori benigni e potrebbe essere legata alla trasformazione neoplastica per diverse caratteristiche. L'ipometilazione è legata allo sviluppo tumorale da tre meccanismi: In primo luogo l'ipometilazione determinerebbe l'instabilità cromosomica: la diminuzione dei gruppi metilici favorisce la ricombinazione mitotica i meccanismi di delezione e di traslocazione promuovendo il riarrangiamento cromosomico. L'ipometilazione determina in seconda istanza l'attivazione di elementi trasponibili (ad esempio Alu ed L1) che potrebbero migrare in regioni genomiche diverse alterando l'espressione genica. La terza conseguenza che si osserva è la perdita dell'imprinting. Altre caratteristiche peculiari dell'ipometilazione sono:

- l'attivazione di oncogeni come H-RAS, CAGE i cui promotori sarebbero normalmente metilati nel tessuto sano;
- fenomeni di resistenza alla terapia: l'ipometilazione dei promotori di geni Multidrug Resistance determina un'attivazione di questi ultimi e quindi una diminuzione della risposta alla terapia;
- l'ipometilazione generalizzata potrebbe essere dovuta all'inattivazione per ipermetilazione del promotore dei geni mismatch repair.

Se si sta cominciando a comprendere qualcosa sulle conseguenze dell'ipometilazione, si sa ancora troppo poco sulle cause della stessa.

La seconda alterazione epigenetica presente nei tumori è **l'ipermetilazione dei promotori dei geni oncosoppressori**. I geni coinvolti da questo meccanismo controllano solitamente il ciclo cellulare, la riparazione del DNA, il metabolismo dei cancerogeni, interazione intercellulare, l'apoptosi, l'angiogenesi e tutti quei geni che sono solitamente coinvolti nello sviluppo del cancro. Il profilo di metilazione dei promotori è tumore-specifico ciò prende il nome di DNA-“metiloma”. Ciò che non è stato ancora compreso è come le CpG Islands divengano ipermetilate in alcuni tipi di tumore ma non in altri anche se l'inattivazione di un particolare gene mediante metilazione può dare ad un tumore un particolare vantaggio proliferativo.

La **modificazione degli Istoni** costituisce un terzo grande capitolo delle alterazioni epigenetiche nel cancro. La modificazione degli istoni si verificano in diverse proteine istoniche sui residui di serina, arginina e lisina. L'acetilazione e la metilazione degli istoni hanno un effetto diretto in una moltitudine di processi nucleari che includono la trascrizione genica, la riparazione del DNA, la duplicazione del DNA e l'organizzazione dei cromosomi. L'acetilazione degli istoni è solitamente associata con l'attivazione trascrizionale; la metilazione determina effetti diversi a seconda del tipo di aminoacido e della posizione di questo.

L'ipermetilazione delle CpG Islands nella regione dei promotori dei geni oncosoppressori è associata con un particolare tipo di fenotipo istonico. Queste alterazioni al pari dell'ipermetilazione dei promotori appaiono molto precocemente ed aumentano con il progredire della malattia. Alterazioni degli istoni sono state ritrovate nel tumore del fegato, della mammella e della prostata; in particolare sono stati proposti come marcatori per alto rischio di ricorrenza (111).

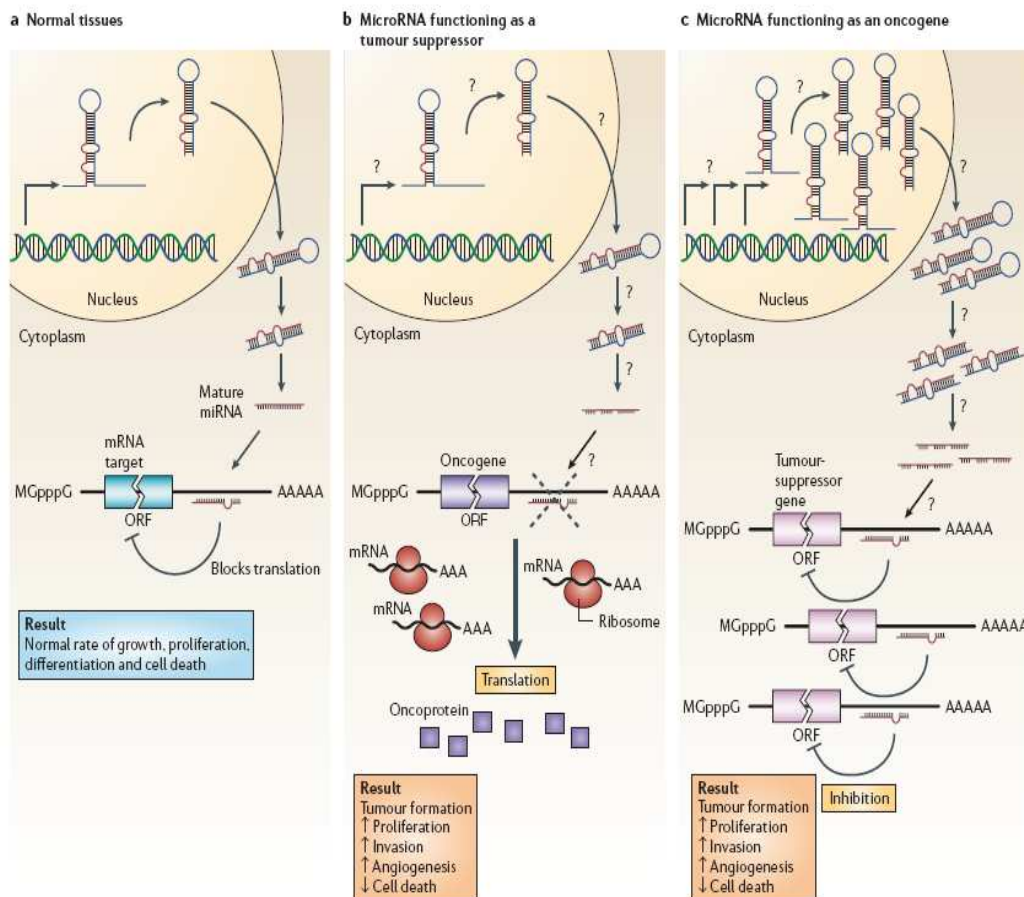
I meccanismi epigenetici includono un gruppo di proteine, le **Polycomb (PcG)**, che hanno un ruolo nella cancerogenesi e nelle disfunzioni geniche. I PcG sono un gruppo di proteine che svolgono un importante ruolo nello sviluppo embrionale e nell'inibizione dell'espressione dei geni Homeobox. Le PcG formano complessi proteici multimerici la cui funzione è quella di determinare un silenziamento a lungo termine dell'espressione di numerosi geni attraverso modificazioni post-trascrizionali<sup>5</sup>. Essi sono fondamentali per la differenziazione "stabile" cellulare. Durante lo sviluppo degli organismi multicellulari, le cellule si differenziano le una dalle altre mediante cambiando il loro programma genetico in risposta a diversi stimoli. La funzione dei PcG sarebbe quella di mantenere la "Memoria Cellulare" mediante un meccanismo capace di ricordare alla cellula il proprio "destino" funzionale<sup>6</sup>. Ad ora sono stati scoperti prevalentemente due gruppi di complessi multimerici PcG: PRC1 e PRC2. L'equilibrio tra questi due gruppi è necessario per una corretta replicazione e per la proliferazione cellulare.

Molto poco si conosce tuttavia sui meccanismi di trasformazione maligna e su come le PcG siano associate con i loro geni bersaglio. Negli ultimi due anni si è posta molta attenzione su Ezh2 un componente di PRC2 il quale risulta fortemente espresso nel tumore della prostata. L'iperespressione di questa componente si associa ad un tumore più aggressivo e con capacità metastatiche notevoli.

L'importanza dei PcG risiede nella peculiarità della loro funzione essi sono un meccanismo di controllo dell'epigenetica in genere che già di per se è un meccanismo di controllo. La conoscenza su questo gruppo di proteine è ancora ad uno stato "embrionale". Il loro studio potrà dare risposte interessanti nell'ambito della conoscenza dei meccanismi più reconditi della cancerogenesi, tuttavia un'applicazione clinica degli stessi è ancora molto lontana.

L'ultimo meccanismo di regolazione epigenetica è dato dai **MicroRNA (MiRNAs)**. Essi sono piccoli RNA della lunghezza di circa 22 nucleotidi che regolano l'espressione genica mediante un legame dato dall'appaiamento grazie alla complementarietà di sequenza con una regione posta in 3' dell'mRNA bersaglio. Il risultato di ciò è la degradazione dell'mRNA o l'inibizione della traduzione di quest'ultimo. Il pattern di espressione dei miRNAs è strettamente controllato e gioca un importante ruolo nella proliferazione cellulare, differenziazione e apoptosi. La

scoperta di un numero di geni che vengono inattivati dall'espressione dei miRNA sta crescendo rapidamente, sottolineando l'importanza di questo meccanismo nel controllo dell'espressione genica. Un unico miRNA è in grado di controllare l'espressione di centinaia di geni.



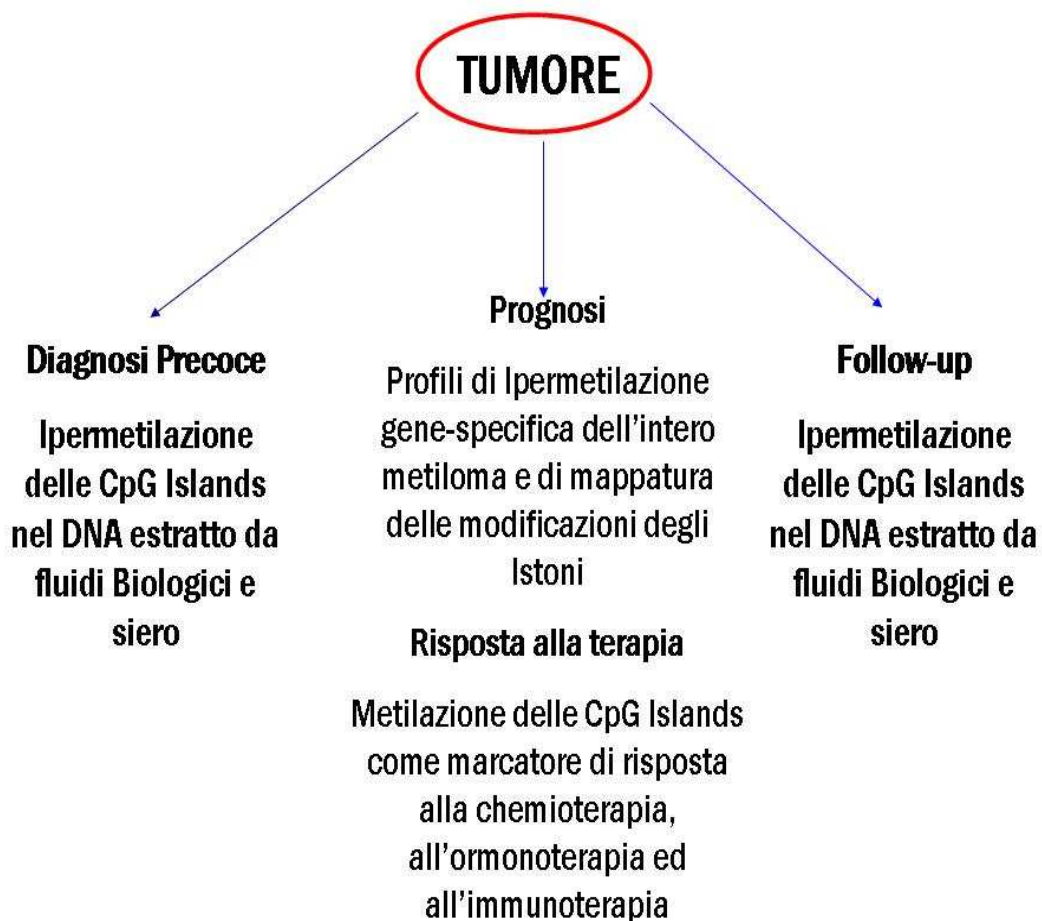
**Figura 4.** Funzione dei MicroRNA come Oncogeni e geni Oncosoppressori (modificato da Esquela Kerscher A & Slack FJ. *Oncomirs – microRNA with a role in cancer*. Nat Cancer Rev. 2006; 6: 259-69)

Recenti osservazioni hanno dimostrato come i miRNAs possano funzionare come geni onco-soppressori o come oncogeni (112) e per questo vengono chiamati “oncomirs”; il loro ruolo nella regolazione dell'espressione dei suddetti geni è illustrata in figura 4.

L'epigenetica rappresenta oggi sicuramente l'aspetto più innovativo per un approccio alla malattia neoplastica: come illustrato in figura 5 essa avrà un suo importante

utilizzo in clinica grazie alle aspettative che vanno verso tre diverse direzioni: la diagnosi precoce di malattia, la determinazione della prognosi e il follow-up.

Anche nel tumore del Colon le evidenze fino ad ora presenti testimoniano alterazioni epigenetiche fin dai primi stadi di sviluppo della malattia.



**Figura 5.** Applicazioni cliniche delle modificazioni epigenetiche in oncologia. Modificato da Mulero-Navarro S, Esteller M. *Epigenetic biomarkers for human cancer: The time is now.* Crit Rev Oncol/Hematol.

- Marcatori Epigenetici in Oncologia

Le nuove scoperte sulle alterazioni epigenetiche nel cancro hanno posto le basi per la creazione di un pannello di markers con una funzione di screening, di diagnosi, ma soprattutto di prognosi nella malattia neoplastica

Harden in uno studio del 2003 osservava come una ipermetilazione dei promotori di alcuni geni studiata mediante una metodica QMSP (Quantitative Methylation Specific

PCR) permetteva di predire una prognosi peggiore nei pazienti con uno stadio precoce di Non Small Cells Lung Cancer laddove il marcatore epigenetico fosse risultato positivo.

Diversi lavori hanno confermato questa osservazione anche nei tumori rispettivamente della tiroide, della mammella, della vescica e dei tumori testa collo.

L'ipermetilazione dei promotori di molti geni oncosoppressori è stata proposta in molti lavori come bio-marcatore per studiare la presenza di cellule neoplastiche disseminate in alcuni compartimenti del corpo: siero/plasma, urina, feci, FNA (Fine Needle Aspiration) ed altri fluidi corporei. Queste metodiche oltre a risultare estremamente significative in termini di risultati permettono di acquisire il campione in modo estremamente semplice.

Le tecnologie basate sullo studio della metilazione del DNA hanno un promettente futuro sia in campo diagnostico che in campo terapeutico: esse permettono infatti di identificare, seppure in modo indiretto, cellule neoplastiche ma sono anche utili come marcatori per valutare in base all'espressione o meno di un determinato gene la risposta alla terapia.

Il razionale su cui si fonda l'ipotesi di utilizzo dei marcatori epigenetici è data dall'osservazione che il pattern di metilazione differisce non solo da tessuto a tessuto, ma all'interno dello stesso tessuto assume una differenza sostanziale tra tessuto sano e tessuto malato. Inoltre l'utilizzo del marcatore epigenetico potrebbe rivelarsi utile per lo studio dell'avanzamento della malattia grazie all'evidenza che con la progressione delle alterazioni neoplastiche da metaplasia a tumore maligno si associano alterazioni della metilazione ad ogni passaggio.

La scoperta della conversione delle citosine non-metilate in uracile mediante il trattamento del DNA con Sodio – Bisolfito ha fornito la base razionale per la costruzione di una PCR che tenesse conto di questa alterazione e quindi fosse in grado di dimostrare non solo la presenza o meno di metilazione ma anche di poterla quantizzare grazie alla più moderna QMSP (Quantitative Methylation Specific PCR). Ciò permette di valutare in modo quantitativo lo stato di metilazione del gene indagato.

La possibilità di reperire DNA è molto importante per l'attuazione delle suddette analisi. Si è osservato che nei fluidi corporei (siero o nelle urine o nella saliva o nelle



feci) dei pazienti oncologici la quantità di DNA circolante è maggiore<sup>7</sup> probabilmente a causa dell'aumento dei fenomeni di necrosi e di apoptosi a livello del tessuto tumorale.

Altri obiettivi dei markers epigenetici potrebbero essere quelli di valutare l'*assessment* del rischio del paziente. La metilazione del promotore del gene MLH1 determina la riduzione dell'espressione di questi e ciò diviene la causa di LOI (loss of imprinting) che a causa dell'instabilità dei microsatelliti determina un aumento del rischio di favorire il processo di cancerogenesi a causa di successive alterazioni del genoma.

È importante distinguere marcatori con funzione unicamente "predittiva" del comportamento biologico (invasività, tasso di crescita o capacità di determinare angiogenesi) da markers con una funzione prevalentemente "predittiva" in campo terapeutico ossia che possano prevedere quella che sarà la risposta al farmaco; entrambi possono essere di aiuto all'oncologo clinico gli uni nel predire la prognosi gli altri nella scelta del trattamento.

I marcatori epigenetici rappresentano un possibile marcatore tumore specifico costituendo nelle cellule tumorali uno specifico "fenotipo di metilazione". Toyota partendo dall'osservazione che nel tumore ed in particolare in quello del Colon si assiste ad una diminuzione dello stato di metilazione ha studiato trenta geni rispettivamente in linee cellulari normali, invecchiate e cancerose. Egli ha osservato che il pattern di metilazione variava a seconda del tipo cellulare e nel tumore si veniva a costituire un particolare fenotipo di metilazione nelle CpG Island (CpG Island Methylator Phenotype – CIMP) tumore specifico. Questa evidenza potrebbe fornire una base razionale per la costruzione di un marcatore epigenetico tumore specifico.

Basandosi su queste osservazioni Issa ha ipotizzato la teoria dei "CIMP" (113). Seppure questa teoria non è ad oggi universalmente accettata altri studi hanno dimostrato che la metilazione non avviene in modo casuale, ma in maniera assolutamente selettiva tanto che ogni istotipo tumorale ha una specifica identità, uno specifico fenotipo di metilazione. Il fenotipo "CIMP" fu successivamente analizzato per altri tipi di tumore e si scoprì che era associato a caratteristiche istopatologiche e genetiche distinte. Il fenotipo di metilazione delle CpG rappresenta l'ultimo step di un

processo continuo di alterazioni genetiche ed epigenetiche. La scoperta del fenotipo CIMP conferma in un certo senso che le alterazioni del fenotipo di metilazione non rappresentino altro che un'alterazione dei meccanismi di controllo della metilazione stessa che causa un profilo di metilazione alterato.

- Significato Clinico e Vantaggi dei Marcatori Epigenetici

La teoria di Feinberg sul modello epigenetico staminale del cancro la quale ha dimostrato come le alterazioni epigenetiche siano molto precoci e possano precedere di anni lo sviluppo della patologia tumorale ha dato una conferma ed una validità notevole ai tanti studi sulla metilazione che si sono fatti sin dalla scoperta. La metilazione dei promotori rappresenta inoltre un target molto plausibile per lo studio e per la scoperta di marcatori diagnostici, prognostici o di risposta alla terapia. La lista dei geni ipermetilati che si è proposto di utilizzare come marcatori è molto ampia (114) (figura 6). L'utilizzo di geni ipermetilati come biomarkers pone numerosi vantaggi:

- Le alterazioni della metilazione sono caratteristici delle cellule neoplastiche. Questa proprietà può essere sfruttata nella diagnosi e nella valutazione della progressione neoplastica.
- Le tecniche per lo studio dell'ipermetilazione come la MSP (methylation specific PCR), la QMSP (Quantitative Methylation Specific PCR), l'HPLC (High-Performance Capillary Electrophoresis), sono tecniche veloci e molto sensibili.
- Il DNA necessario per lo studio è una molecola straordinariamente stabile e può essere ottenuta da una serie di tessuti freschi: secrezione mammaria, saliva, urine, plasma, tessuti tumorali primitivi, plasma, materiale ottenuto dal lavaggio bronchiolo-alveolare.
- I marcatori epigenetici possono essere utilizzati anche per prevedere come potrà variare la risposta alla terapia. Nei pazienti in stadio avanzato di malattia la valutazione dell'espressione di alcuni geni mediati dalla metilazione può essere estremamente importante nel predire la risposta ad un determinato trattamento. Alcuni agenti alchilanti come la procarbazona, la streptozotocina la temozolomide vengono utilizzati per il trattamento del tumore, questi farmaci

determinano alterazione della molecola del DNA, l'efficienza dei meccanismi di riparazione della molecola di DNA potrebbe rappresentare un importante meccanismo di resistenza alla chemioterapia. Valutare quindi lo stato di espressione mediante l'analisi di espressione con la valutazione dello stato di metilazione di MGMT, un gene addetto alla riparazione del DNA potrebbe essere un ottimo meccanismo per valutare la risposta alla terapia.

Hypermethylated gene	Possible clinical uses
p16INK4a	Risk assessment in colon and endometrial cancer Detection of neoplastic cell in liver and lung Progression of oral squamous cell carcinoma
p14ARF	Detection of cancer cells in brain Progression of oral squamous cell carcinoma
MGMT	Risk assessment in colorectal carcinoma Detection of cancer cells in lung cancer Response to treatment in gliomas
APC	Detection in colorectal carcinoma and breast cancer
BRCA1	Response to treatment in breast and ovary
hMLH1	Risk assessment in colon, gastric and endometrial cancer Response to treatment
SFRP1	Related with unfavourable prognosis in breast cancer
DAPK	Recurrence of bladder cancer
CDH1	Related with unfavourable prognosis
CDH13	Related with unfavourable prognosis
THBS-1	Related with unfavourable prognosis
FAT tumor suppressor cadherin	Related with unfavourable prognosis
GSTP1	Detection of cancer cell in prostate cancer Response to treatment
ER	Response to treatment
AR	Response to treatment
PR	Response to treatment

**Figura 6.** Markers epigenetici (Modificato da Mulero-Navarro S, Esteller M. *Epigenetic biomarkers for human cancer: The time is now.* Crit Rev Oncol/Hematol. 2008; doi:10.1016/j.critrevonc.2008.03.001)

- Un'ulteriore conferma alla validità clinica del marker epigenetico deriva dal fatto che sia le mutazioni genetiche che le alterazioni epigenetiche sono necessarie affinché si sviluppi il tumore. Uno studio molto recente ha analizzato e confrontato le mutazioni genetiche con le alterazioni epigenetiche nel tumore del Colon (115). In questo studio si è valutato infatti attraverso una metodica di studio di espressione quali fossero i geni con probabile funzione di geni oncosoppressori non espressi nel tumore. Una volta identificati questi geni si è valutato quale fosse il meccanismo alla base della mancata espressione: mutazione genetica o ipermetilazione del promotore. I risultati hanno dimostrato che il silenziamento è dovuto nel 90% dei casi ad ipermetilazione.
- Nell'ambito dello screening, la possibilità di utilizzare un biomarcatore multiplo come può essere l'utilizzo di un pannello epigenetico permette di raggiungere una specificità ed una sensibilità molto alta: l'utilizzo di un marcatore singolo è di solito rischioso da un punto di vista statistico quando deve essere applicato su una popolazione di massa.

Grazie a questi risultati si può dedurre che l'utilizzo di un marcatore epigenetico sia molto più sensibile di un marcatore basato sull'identificazione di una mutazione. Lo studio della metilazione dei promotori è prioritario per identificare cellule tumorali, un marcatore diagnostico/prognostico non può prescindere dall'utilizzo delle tecniche di analisi dello stato di metilazione.

## **2. OBIETTIVO DELLA TESI**

L'obiettivo primario del presente lavoro consiste nella validazione di due nuovi marcatori tumorali di tipo epigenetico, rappresentati dal gene  $\beta$ 4GalT1 e KIF1A, al fine di migliorare il management diagnostico e terapeutico in pazienti affetti da tumore del colon-retto e del pancreas. A tal proposito è stato condotto uno studio retrospettivo, basato sull'analisi di metilazione del gene  $\beta$ 4GalT1 in una popolazione eterogenea di pazienti affetti da adenocarcinoma del colon-retto, selezionata nel periodo di tempo compreso tra l'anno 2001 e l'anno 2009, presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma e l'Istituto Cantonale di Patologia Canton Ticino.

Gli obiettivi specifici dello studio sono stati pertanto i seguenti:

- validare  $\beta$ 4GalT1 metilato come marcatore tumore-specifico e tessuto-specifico in una popolazione eterogenea di pazienti affetti da adenocarcinoma del colon-retto;
- analizzare i livelli di metilazione di  $\beta$ 4GalT1 nelle fasi di adenoma e adenocarcinoma
- stabilire una diretta correlazione tra l'ipermetilazione del gene  $\beta$ 4GalT1 e la riduzione dei livelli d'espressione del corrispondente prodotto proteico nell'ipotesi che la metilazione aberrante di  $\beta$ 4GalT1 sia in grado di influenzare i livelli di espressione della corrispondente proteina.
- validare KIF1A metilato come marcatore tumore-specifico e tessuto-specifico in una popolazione di pazienti affetti da adenocarcinoma del pancreas.

## **3. MATERIALI E METODI**

### **3.1 Arruolamento dei Pazienti e Raccolta dei Campioni**

130 campioni di carcinoma colon rettale e mucosa normale appaiata sono stati retrospettivamente raccolti dall'archivio del Dipartimento di Anatomia Patologica di due ospedali (Università Campus Bio-Medico di Roma 52 casi; Istituto di Patologia,

Locarno Svizzera 78 casi) e conservati in accordo con le linee guida delle rispettive istituzioni. I 52 casi di tessuti freschi sono stati congelati immediatamente dopo la chirurgia e mantenuti a -80°C. I 78 casi provenienti dall'Ospedale di Locarno sono stati invece inclusi in paraffina. Lesioni sincrone di adenocarcinoma, adenoma e mucosa colica normale sono state ottenute da 13 casi presso il dipartimento di Patologia di Locarno. 24 casi sono stati inizialmente usati come training set e 106 casi come validation set. Inoltre sono stati raccolti 60 casi di adenocarcinoma del pancreas e inclusi in paraffina.

### **3.2. Estrazione del DNA**

Il tessuto tumorale primario ed il midollo sono stati rapidamente congelati alla temperatura di -80°C.

I tumori primitivi congelati al momento dell'estrazione sono stati inclusi in OCT. Si sono ottenute sezioni di 5 micron da tumore primario per la colorazione ematossilina-eosina per la valutazione della presenza di carcinoma del Colon. Si sono considerati validi per l'analisi molecolare quei campioni contenenti almeno il 70% di cellule tumorali. Da questo tessuto sono state ottenute ulteriori sezioni da 12 micron. Queste sezioni sono state utilizzate per l'estrazione del DNA.

Il protocollo di estrazione prevedeva (previa paraffinatura nel caso di campioni inclusi in paraffina) :

1. la digestione del tessuto in tubi da 2ml in 1 ml di soluzione SDS/PK;
2. l'incubazione a 48°C overnight ;
3. l'aggiunta di 1 ml di fenolo – cloroformio;
4. il campione è stato vortexato per 1 min, quindi centrifugato a 2500 rpm per 10 minuti;
5. è stata prelevata la fase acquosa alla quale è stato aggiunto 1 ml di fenolo – cloroformio il supernatante è stato trasferito in un altro tubo da 2 ml;
6. è stata aggiunta una quantità pari ad 1/3 del volume del supernatante di Ammonio Acetato 7,5 M;
7. quindi è stata aggiunto etanolo 100% in un volume pari a 2 volte e mezzo quello iniziale;
8. i campioni sono stati centrifugati a 6000 rpm 4° C per un ora;

9. è stato eliminato il supernatante ed il pellet è stato risospeso in in 1 ml di etanolo 70% per 15 minuti a 6000 rpm 4° C;
10. il pellet, asciugato, è stato risospeso in LoTE;
11. la misura della concentrazione è stata effettuata utilizzando lo spettrofotometro Nanodrop®;
12. il DNA è stato conservato a -20°C.

### 3.3. Trattamento con Sodio Bisolfito

La metilazione del DNA interessa esclusivamente i residui di citosina, all'interno delle aree ricche in CG. Esse sono solitamente raccolte in aree del promotore con una funzione di regolazione dell'espressione genica.

L'incubazione del DNA con Sodio Bisolfito determina una conversione dei residui di citosina non metilati in uracile lasciando invariati i residui di citosina metilati. **Errore. Il segnalibro non è definito.** Il trattamento con sodio bisolfito permette di avere una differente sequenza di DNA.

Il trattamento con bisolfito è stato eseguito con il Kit EpiTect® della Qiagen .

La figura 7 e 8 illustrano le modificazione apportate dal trattamento.

	<b>Sequenza Originale</b>	<b>Sequenza dopo Trattamento con Bisolfito</b>
<b>DNA non metilato</b>	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-U-G-N-U-G-N-U-G-N
<b>DNA Metilato</b>	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N

**Figura 7.** Modificato da *EpiTect® Bisulfite Handbook*

Il protocollo di reazione per il trattamento con Sodio Bisolfito prevede:

1. preparare le reazioni del trattamento con bisolfito in tubi da 0,2 ml. In ogni tubo devono essere presenti 2 µg di DNA in un volume massimo di 20 µl acqua RNAsi Free per portare ad un volume di reazione pari a 140 µl, 85 µl di soluzione mix di Bisolfito; 35 µl di Protect Buffer per giungere ad un volume finale di reazione pari a 140 µl.

2. i tubi da 0,2 ml devono essere posti in un normale termociclatore. Le condizioni di reazione sono quelle illustrate in figura 8.

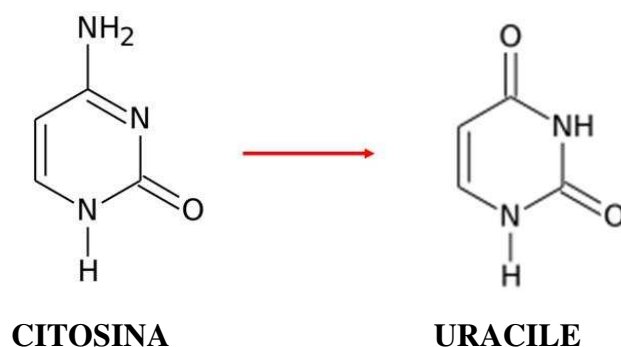
<b>STEP</b>	<b>Durata</b>	<b>Temperatura</b>
DENATURAZIONE	5 min	99° C
INCUBAZIONE	25 min	60° C
DENATURAZIONE	5 min	99° C
INCUBAZIONE	85 min	60° C
DENATURAZIONE	5 min	99° C
INCUBAZIONE	175 min	60° C
MANTENIMENTO	indedinito	20° C

#### Steps di PCR

3. una volta che la reazione è terminata i tubi da PCR devono essere brevemente centrifugati e quindi per completare la reazione devono essere posti in tubi da 1,5 ml
4. si aggiungono 560 µl di buffer BL contenenti 10 µg/ml di RNA carrier. La soluzione deve essere vortexata e centrifugata leggermente.
5. si aggiungono 560 µl di etanolo al 100%. La soluzione deve essere vortexata e centrifugata leggermente.
6. a questo punto si preparano delle colonne Epiect all'interno delle quali si pongono 630 µl della soluzione di cui allo step precedente
7. la colonna deve essere centrifugata alla massima velocità per 1 minuto e si getta via la parte liquida della soluzione che si sarà raccolta all'interno del tubo;
8. a questo punto si pone nel tubo la quantità di soluzione residua dallo step 5
9. la colonna deve essere centrifugata alla massima velocità per 1 minuto e si getta via la parte liquida della soluzione che si sarà raccolta all'interno del tubo.



10. si aggiungono 500  $\mu$ l di buffer BW (buffer di lavaggio) alla colonna, si centrifuga alla massima velocità per 1 minuto e si getta la soluzione che si raccoglie nel tubo.
11. si aggiungono 500  $\mu$ l di buffer BD (buffer di desolfonazione) nella colonna e si pone in incubazione per 15 minuti a temperatura ambiente.
12. la colonna deve essere centrifugata alla massima velocità per 1 minuto e si getta via la parte liquida della soluzione che si sarà raccolta all'interno del tubo.
13. si aggiungono 500  $\mu$ l di buffer BW (buffer di lavaggio) alla colonna e si centrifuga alla massima velocità per 1 minuto e si getta la soluzione che si raccoglie nel tubo.
14. si ripete lo step 13 una volta
15. si pone la colonna all'interno di un nuovo tubo da 2 ml e si centrifuga alla massima velocità per 1 minuto al fine di eliminare qualsiasi residuo liquido.
16. si pone la colonna in un tubo da 1,5 ml pulito. Si aggiungono 20  $\mu$ l di buffer EB (buffer di eluizione) al centro della membrana e si eluisce il DNA purificato con una centrifugazione a 12000 rpm per circa 1 minuto.



**Figura 8.** reazione di desolfonazione mediata dal Sodio Bisolfito nelle citosine non metilate.

### 3.4. Analisi di metilazione con QMSP (PCR quantitativa metilazione-specifica)

Sono state usate numerose metodologie per la determinazione dello stato di metilazione in campioni di tumore derivati da biopsie di tessuto, sputo, siero/plasma, feci, ecc. Una delle più usate è la MSP (PCR Metilazione Specifica) in cui i primers sono disegnati in maniera complementare per evidenziare un DNA totalmente metilato e non-metilato nel quale il set dei primers differisce solo per la posizione CG del bisolfito convertita nella sequenza originale: primer metilati contenenti nucleotidi CG e primer non metilati contenenti TG nello stesso sito.

Tale metodo è ritenuto di grande importanza per l'efficienza della analisi di valutazione del DNA, come dimostra il numero di citazioni del manoscritto in cui è descritta per la prima volta tale metodologia. Tuttavia la limitazione dell'analisi MSP in termini di applicazione clinica, risiede nel fatto di non essere quantitativa e specificità poco specifica a causa di falsi positivi quando le condizioni di PCR usate non siano quelle ottimali. Per ovviare a tali problemi, è stata sviluppata un'altra metodica la QMSP (Quantitative Methylation Specific PCR) basata sulla tecnologia Taqman<sup>8</sup>. Nella QMSP, il DNA trattato col bisolfito è usato come substrato per

l'amplificazione in reazioni separate di un promotore target metilato e di una sequenza di riferimento (gene della beta-actina).

Le reazioni sono condotte rispetto ad una soglia predeterminata basata sulla costruzione di curve standard derivanti da diluizioni seriali di DNA metilato in vitro e successivamente sottoposto a trattamento con bisolfito. La fluorescenza che ne deriva, viene convertita in dati numerici rapportati a una curva standard predeterminata, e calcolando l'intervallo del valore del promotore target rispetto alla sequenza di riferimento. Tale numero è un valore assoluto in unità di fluorescenza e teoricamente riflette il valore di una sequenza metilata contenuta in un dato campione. Tale numero può variare in un largo intervallo dipendente dalla prevalenza di CpG metilate nella sequenza usata come target. La sequenza di riferimento è usata per normalizzare i campioni di DNA e per determinare la qualità della conversione col bisolfito. La QMSP permette la quantizzazione del livello di metilazione di geni candidati selezionati per carcinomi del colon primari, ed in futuro per linfonodi e campioni di midollo.

La QMSP è stata messa a punto per il gene  $\beta$ 4GalT1, e sono stati utilizzati i seguenti primers:  $\beta$ 4GalT1-F (5'-3') TAGGAAACGGGTTTCGACG E  $\beta$ 4GalT1-R in aggiunta di un probe fluorogenico  $\beta$ 4GalT1-(6FAM 5'-3' TAMRA) CGTTAAACAACGAAATCCAACCGAA, producendo un amplificato di 151 bp. Il DNA leucocitario è stato estratto dal sangue di un donatore sano. Tale DNA è stato trattato per la metilazione in vitro con un eccesso di SssI methyltransferase (New England Biolabs Inc., Beverly, MA), per generare un DNA completamente metilato. Diluizioni seriali (90-0.009 ng) di questo DNA sono state utilizzate per costruire la curva di calibrazione per il gene  $\beta$ 4GalT1.

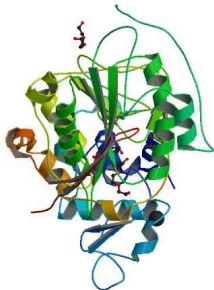
La reazione di amplificazione è stata effettuata in triplicato in un volume di 25  $\mu$ L costituito da 600 nM di ciascun primer, 200 nM di probe, 0.75 unità di *Platinum Taq polymerase* (Invitrogen, Carlsband, Ca), 200  $\mu$ M per ogni dNTPs; 16,6 mM di Ammonio Solfato; 67mM di Trizma; 6,7mM MgCl<sub>2</sub> 10mM di Mercaptoetanolo e 0,1% di DMSO. La reazione di amplificazione è stata ottenuta in piastre da 96 pozzetti in una macchina *fast 7900 real-time* (Applied Biosystem, Foster City, CA). Le condizioni di PCR erano le seguenti: uno step a 95°C per 2 minuti, 40 cicli a 95°C

per 15 secondi e un ultimo ciclo a 60° C per 1 minuto. Per ogni piastra è stata inclusa una curva di calibrazione per il gene  $\beta$ 4GalT1, i campioni di DNA dei pazienti, controlli positivi (CpGenome™ Universal Methylated DNA, Serologicals Corp., Norcross, GA), e blanks multipli. Il livello relativo di DNA metilato è stato determinato come rapporto tra “Quantity Mean “  $\beta$ 4GalT1/ “Quantity Mean “ beta-actina e quindi moltiplicato per 1000 per una tabulazione più semplice. Per ogni campione l’analisi QMSP è stata ripetuta in tre esperimenti separati ed è stata il valore della mediana è stato considerato per l’analisi statistica.

### 3.5 Selezione di $\beta$ 4-GALT1 e KIF1A

Sulla base del progetto “Metiloma” nell’ambito dei geni metilati in maniera tumore-specifica nelle neoplasie colon rettili, abbiamo selezionato uno dei geni che dopo analisi MSP (Methylation Specific PCR) mostra la maggior frequenza di metilazione (100%) e la maggior specificità tumorale (0% di metilazione nella mucosa normale), ovvero il gene  $\beta$ 4Gal T1.

**$\beta$ 4-GALT1:** il gene beta 1,4-galattosiltransferasi (Figura 9) appartiene ad una



**Figura 9.** Struttura proteica di  $\beta$ 4-GAL T1

famiglia di 7 geni che codificano per una famiglia di proteine coinvolte nei meccanismi di *galattosilazione*. Questi geni codificano per glicoproteine legate alla membrana. Per la somiglianza tra le diverse strutture proteiche  $\beta$ -4-Gal T esse vengono suddivise in quattro gruppi: al primo gruppo appartengono  $\beta$ 4Gal T1 e  $\beta$ 4Gal T2, al secondo gruppo  $\beta$ 4Gal T3 e  $\beta$ 4Gal T4, al terzo  $\beta$ 4Gal T5 e  $\beta$ 4Gal T6, ed al quarto gruppo  $\beta$ 4Gal T7. la funzione principale di questi enzimi consiste nell’aggiungere galattosio ad una N-acetilglucosamina.

**KIF1A:** Le kinesine del genoma umano identificate fino ad ora sono circa 45 e sono state classificate in 14 famiglie (dalla kinesina 1 alla 14). Hanno un ruolo fondamentale a diversi stadi della divisione cellulare e del trasporto intercellulare di vescicole e organelli attraverso i microtubuli del citoscheletro, utilizzando l’idrolisi

dell'ATP. KIF1A è noto per essere un trasportatore assonale di vescicole sinaptiche ed è stato descritto come un potenziale oncosoppressore nel carcinoma nasofaringeo.

### 3.6 Analisi Statistica

Il cut-off ottimale calcolato è stato scelto per massimizzare la sensibilità e la specificità del saggio e per categorizzare i campioni come metilati o come non metilati. Il cut-off è stato determinato disegnando le curve ROC usando il livello di metilazione nella mucosa normale e nei campioni tumorali. L'AUC (Area Under Curve), è stata usata come misura della bontà del test. La frequenza di metilazione, il range interquartile e la mediana per  $\beta$ 4Gal T1 e KIF1A sono stati determinati per i gruppi di studio (tessuti tumorali e normali).

La frequenza con cui il promotore  $\beta$ 4Gal T1 e KIF1A è risultato metilato è stata paragonata a quella di un promotore completamente non metilato (*beta-actina*) utilizzando il test Mann Whitney  $U^9$   $^{10}$ .

Il test di Fisher è stato usato per porre in correlazione la frequenza di distribuzione dei geni metilati tra i gruppi sperimentali.

## 4. RISULTATI

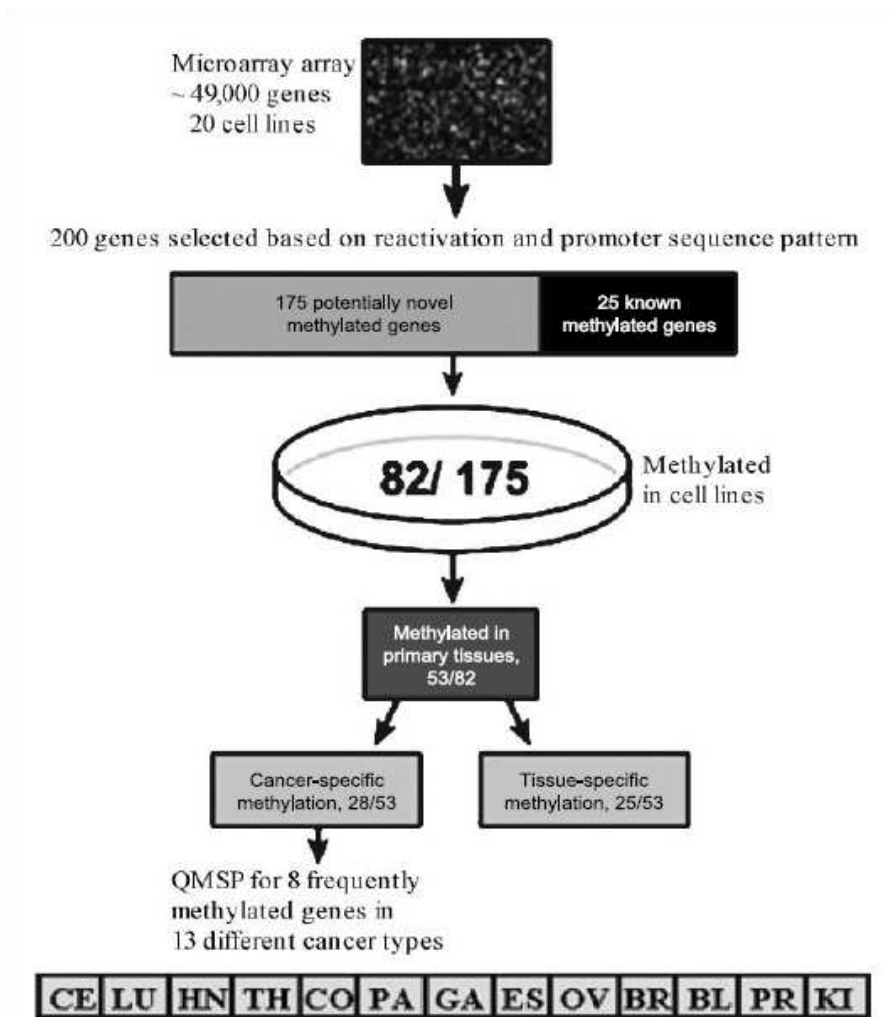
### 4.1 Discovery del “Cancer Methylome”

In collaborazione con l'“Head and Neck Cancer Research Division” della Johns Hopkins University di Baltimora, MD, USA, diretta dal prof. D. Sidransky, ho potuto partecipare al “*Progetto Metiloma*” per individuare nuovi geni metilati in maniera tumore specifica. Il “*Progetto Metiloma*” è stato condotto mediante l'iniziale analisi dell'espressione di circa 49.000 geni con tecnologia *microarray* d'espressione in 20 linee cellulari derivate da 5 diversi istotipi (figura 10). Per mezzo di una strategia, messa a punto dal gruppo della JHU, di smascheramento farmacologico attraverso l'uso di un agente demetilante (5-aza-2'-deossicitidina), è stato possibile selezionare 200 geni, 25 dei quali erano già noti per la loro metilazione tumore-specifica. 175 rappresentavano nuovi geni potenzialmente metilati. Di questi 175 geni, 82 risultavano metilati solo nelle linee cellulari, 53 anche nei tessuti primari di 13 istotipi

diversi. Di questi 53 geni 28/53 presentavano una metilazione tumore-specifica, mentre 25 una metilazione tessuto-specifica (Figura 11).

In particolare, nel tumore del colon e del pancreas l'utilizzo del Bisulfite Sequencing e dell'MSP (Methylation Specific PCR) ha permesso di identificare nuovi geni metilati in maniera tumore-specifica: nel carcinoma del colon sono stati identificati 6 nuovi target tumore-specifici, con una frequenza di metilazione nel tessuto tumorale compresa tra il 60% e il 100%, e assenza di metilazione nella mucosa colica normale, nelle neoplasie del pancreas invece sono stati identificati 5 nuovi geni tumore-specifici con una frequenza di metilazione nel tessuto tumorale compresa tra il 6% e il 75%, e assenza di metilazione nella parenchima sano. Questi dati preliminari ci hanno permesso di iniziare la validazione, mediante QMSP (Quantitative Methylation Specific PCR), di tali marcatori epigenetici in una corte più ampia di campioni (130 tumori primitivi e corrispondente tessuto normale appaiato di carcinomi colon rettali e 60 casi di neoplasie del pancreas).

Il livello di metilazione dei campioni tumorali è stato valutato mediante QMSP (Quantitative Methylation Specific PCR), una tecnica high throughput dotata di una sensibilità molto elevata ed in grado di identificare minime differenze di metilazione tra tessuto tumorale e tessuto sano.



**Figura 10.** Flowchart per la selezione di geni oncosoppressori. Sono state utilizzate 20 linee cellulari tumorali di diversi tumori: CE (cervice), Lu (polmone), HN (testa-collo), TH (tiroide), CO (colon), PA (pancreas), GA (stomaco), ES (esofago), OV (ovaio), BR (mammella), BL (vescica), PR (prostata), KI (rene). Su queste linee cellulari è stata valutata l'espressione in seguito al trattamento con 5-aza-2'deossicitidina e sono stati selezionati 200 geni ed i questi 28 presentavano una metilazione tumore specifica. Da Hoque MO et al. *Genome Wide Promoter Analysis Uncovers Portions of the Genome Cancer Methylome*. *Cancer Res.* 2008; 68: 2661-70

Genes	Loci	Gene name	Proposed function
<i>NISCH</i>	3p21.1	Nischarin	Human I(1)-imidazdine receptor candidate gene, IRAS
<i>PIGH</i>	14q11-q24	Phosphatidylinositol glycan, class H cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) activated	Encodes an endoplasmic reticulum associated-protein that is involved in GPI-anchor biosynthesis
<i>PAK3</i>	Xq22.3-q23	Kinase 3	Critical effectors that link Rho GTPases to cytoskeleton reorganization and nuclear signaling
<i>TUBB4</i>	19p13.3	Tubulin, $\beta$ 4	$\beta$ -tubulin
<i>KIF1A</i>	2q37.3	Kineasin family member 1A	Anterograde motor protein that transports membranous organelles along axonal microtubules
<i>MAL</i>	2cen-q13	T-cell proliferation protein	A candidate linker protein in T-cell signal transduction
<i>ENPEP</i>	4q25	Glutamyl aminopeptidase	Type II integral membrane protein
<i>MCAM</i>	11q23.3	Melanoma cell adhesion molecule	Cell adhesion
<i>SSBP2</i>	5q13.3	ssDNA-binding protein 2	DNA binding
<i>B4GALT1</i>	9p21	$\beta$ 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 1	Elevated level in highly metastatic human lung cancer cells
<i>OSMR</i>	5p12	Oncostatin M receptor	Induces apoptosis in adrenocortical Y-1 tumor cells
<i>NTRK2</i>	9q22.1	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	Receptor for brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3
<i>PAPSS2</i>	10q23.1-q23.2	3'-phosphoadenosin 5'-phosphosulfate synthetase 2	Bifunctional enzyme with both atp sulfurylase and aps kinase activity
<i>SFRP4</i>	7p14.1	Secreted frizzled-related protein 4	Modulators of Wnt signaling
<i>TUBG2</i>	17q21	$\gamma$ -Tubulin gene	Ostomalacia-associated tumors and endometrial and breast carcinomas
<i>PTGS 2</i>	1q25.2-q25.3	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Prostaglandin biosynthesis
<i>NPTX1</i>	17q25.1-q25.2	Neuronal pentraxin I	Calcium ion binding, transport, and synaptic transmission
<i>CCNA1</i>	13q12.3-q13	Cyclin A1	Cell cycle
<i>ASMTL</i>	Xp22.3; Yp11.3	Acetylserotonin O-methyltransferase like	O-methyltransferase activity, S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase activity
<i>TFPI2</i>	7q22	Tissue factor pathway inhibitor 2	Serine-type endopeptidase inhibitor activity, extracellular matrix structural constituent
<i>OGDHL</i>	10q11.23	Oxoglutarate dehydrogenase like	Plays a major role in the citric acid cycle, converting $\alpha$ -ketoglutarate to succinyl CoA
<i>DLL4</i>	15q14	$\delta$ -like 4 ( <i>Drosophila</i> )	Notch binding, calcium ion binding
<i>GDAP1L1</i>	20q12	Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1-like 1	Mutation in human GDAP1 are associated with Charcot-Marie-Tooth-type 4A disease
<i>CIORF166</i>	1p36.12	Hypothetical protein LOC79594	Involved in mediating protein-protein interactions
<i>ARMC7</i>	17q25.1	Amadillo repeat containing 7	Binding
<i>CI3orf18</i>	13q14.12	Protein chromosome 13 open reading frame 18	Protein phosphatase inhibitor activity
<i>C9orf19</i>	9p13-p12	Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1	Extracellular region
<i>HCP1</i>	17q11.2	Home carrier protein 1	Transporter activity

**Figura 11.** Geni metilati in maniera tumore specifica e loro funzione



Type	Gene	Cell lines	Tumor (%)*	Normal (%)*	Method	Type	Gene	Cell lines
COLON	B4GALTI <sup>†</sup>	M	5/5 (100)	0/5 (0)	C-MSP	PROSTATE	NDP	M
	C10orf119	M	0/10 (0)	0/10 (0)	SEQ		APOC1	M
	COPS4	M	0/5 (0)	0/5 (0)	SEQ		ENPEP <sup>†</sup>	M
	CSRP1	M	3/6 (50)	5/5 (100)	SEQ		NBL1	M
	DARS	M	2/9 (22)	4/10 (25)	SEQ		PLTP	M
	FKBP14	M	0/5 (0%)	0/4 (0)	SEQ		MCAM <sup>†</sup>	M
	FN3KRP	M	5/5 (100)	5/5 (100)	SEQ		SSBP2 <sup>†</sup>	M
	FLJ20277	M	5/5 (100)	5/5 (100)	SEQ		MGC15396	M
	HUS1	M	2/9 (22)	0/5 (0)	SEQ		ATXN1	M
	KLF11	M	6/6 (100)	6/6 (100)	SEQ		CD3D	M
	MYBL2	M	9/9 (100)	5/5 (100)	SEQ		FKBP4	M
	MRPL4	M	5/5 (100)	5/5 (100)	SEQ		TFAP2A	M
	MYLK	M	1/10 (10)	0/10 (0)	SEQ	ING4	M	
	OSMR <sup>†</sup>	M	5/5 (100)	0/5 (0)	C-MSP	LEF1	M	
	PAPS52 <sup>†</sup>	M	5/5 (100)	0/5 (0)	SEQ, C-MSP	CENTD3	M	
	RBM52	M	10/10 (100)	10/10 (100)	SEQ	BMP2	M	
	SECTM1	M	0/5 (0)	0/5 (0)	SEQ	CERVIX	PTGS2 <sup>†</sup>	U
	SIRT7	M	4/4 (100)	3/3 (100)	SEQ		NPTX1 <sup>†</sup>	M
	SLC39A4	M	6/9 (67)	10/10 (100)	SEQ, C-MSP		CCNA1 <sup>†</sup>	M
	SLC9A3R1	M	5/5 (100)	5/5 (100)	C-MSP		ASMTL <sup>†</sup>	M
TUBG2 <sup>†</sup>	M	4/7 (60)	0/5 (0)	SEQ, COBRA	TFPI2 <sup>†</sup>		M	
NTRK2 <sup>†</sup>	M	5/5 (100)	0/5 (0)	C-MSP	OGDHL <sup>†</sup>		M	
SFRP4 <sup>†</sup>	M	5/5 (100)	0/5 (0)	C-MSP	ARMC7 <sup>†</sup>		M	
					C13orf18 <sup>†</sup>		M	
LUNG	PAK3 <sup>†</sup>	M	4/5 (80)	1/6 (16)	SEQ	DLL4 <sup>†</sup>	U	
	NISCH <sup>†</sup>	M	7/9 (78)	1/5 (20)	SEQ	C9orf19 <sup>†</sup>	M	
	TUBB4 <sup>†</sup>	M	7/9 (78)	1/5 (20)	SEQ	HCP1 <sup>†</sup>	M	
	PIGH <sup>†</sup>	M	4/4 (100)	1/5 (20)	SEQ	GDAP1L1 <sup>†</sup>	M	
	PHKA2	M	3/17 (18)	1/5 (20)	SEQ	C10orf166 <sup>†</sup>	U	
	CBR3	M	0/15 (0)	0/5 (0)	SEQ	CDK6	M	
	CAMK4	M	1/11 (9)	1/8 (12)	SEQ	PEN13	M	
	HOXB5	M	3/8 (37)	0/7 (0)	SEQ	DDX28	M	
	ZNF198	M	1/13 (8)	0/5 (0)	SEQ	PLCG2	M	
	RG54	M	1/12 (8)	0/5 (0)	SEQ	CLSTN2	M	
	RBM15B	M	15/15 (100)	9/9 (100)	SEQ	RNF123	M	
	PDLIM3	M	2/15 (13)	1/5 (20)	SEQ	DDX54	M	
	ARFGAP3	M	15/15 (100)	9/9 (100)	SEQ	C11ORF45	M	
	VGF	M	0/5 (0)	0/5 (0)	SEQ	TCBA1	M	
	EDG4	M	1/15 (6)	1/5 (20)	SEQ	GNB4	M	
BREAST	KIF1A <sup>†</sup>	M	8/9 (89)	1/6 (17)	SEQ	CLU	M	
	MAL <sup>†</sup>	M	3/6 (50)	0/6 (0)	SEQ	CACNA1C	M	
	GALE	M	ND	3/3 (100)	SEQ			
	HMG20B	M	ND	3/3 (100)	SEQ			
	KRT14	M	ND	3/3 (100)	SEQ			
	CKMT	M	0/6 (0)	0/3 (0)	SEQ			

\*. Number of methylation positive/number of total cases.

ND, not determined.

<sup>†</sup>Cancer-specific methylated genes.

**Figura 12.** Frequenza di metilazione in differenti tipologie tumorali basata sul sequenziamento, COBRA e MSP.

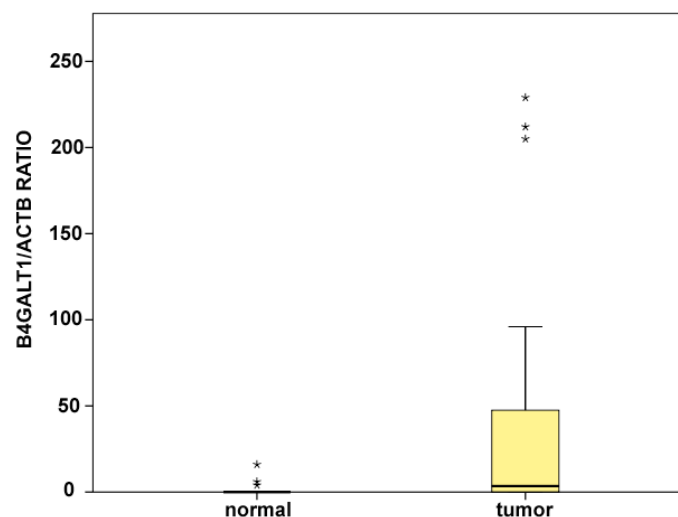
Sulla base dello screening iniziale (figura 1) nell'ambito dei geni metilati in maniera tumore-specifica nelle neoplasie colon rettali, è stato selezionato uno dei geni che

dopo analisi MSP (Methylation Specific PCR) mostra la maggior frequenza di metilazione (100%) e la maggior specificità tumorale (0% di metilazione nella mucosa normale), ovvero il gene beta 1,4-galattosiltransferasi ( $\beta$ 4Gal T1).

Nella seconda parte del nostro studio abbiamo ottimizzato la metodica QMSP (Quantitative Methylation Specific PCR) per il gene  $\beta$ 4GalT1, uno dei 6 geni metilati in maniera tumore specifica nelle neoplasie colonrettali (figura 12) e per il gene KIF1A che è risultato essere il gene con la maggior sensibilità e specificità per l'adenocarcinoma del pancreas.

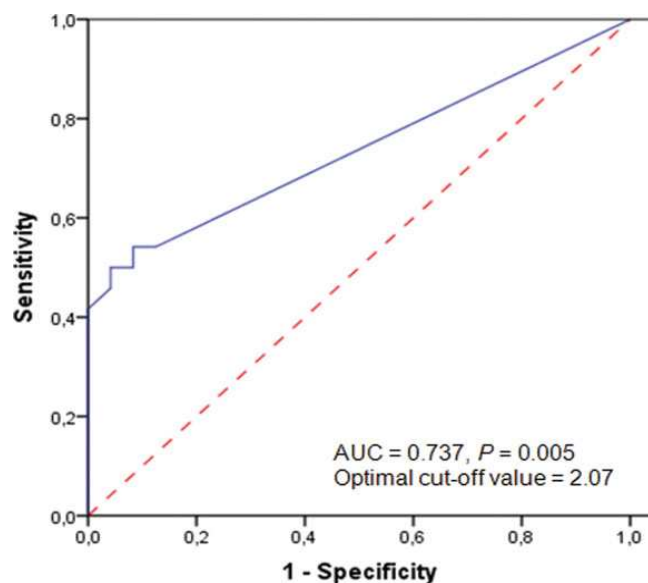
Mediante metodica quantitativa, la QMSP (Quantitative Methylation Specific PCR) è stata condotta una prima analisi su una piccola casistica (24 pazienti, provenienti dall'Università Campus Bio-Medico di Roma), definita "Training Set", che ha permesso di effettuare una valutazione preliminare della frequenza di metilazione di  $\beta$ 4GalT1 nei campioni di tessuto tumorale rispetto alla corrispondente mucosa colica normale nei 24 pazienti in studio.

L'analisi QMSP ha mostrato una differenza statisticamente significativa nel livello di metilazione del gene  $\beta$ 4GalT1 (figura 13) ( $p=0.027$  Mann Whitney Test) e nella frequenza di metilazione ( $p=0.029$  Fisher test) nel tessuto tumorale paragonato al tessuto normale corrispondente dello stesso paziente.



**Figura 13:** Test di Mann-Whitney U. Il grafico mostra una differenza statisticamente significativa nel livello di metilazione del gene  $\beta$ 4GalT1 nei tumori analizzati rispetto alla corrispondente mucosa sana

Successivamente è stata condotta l'analisi della curva ROC (Figura 14) che ha permesso di stabilire il *cut-off* ottimale, scelto per massimizzare la sensibilità e la specificità del saggio e per categorizzare i campioni come metilati o come non metilati. Tale valore è stato utilizzato per l'analisi successiva condotta sul "Validation set". L'AUC (Area Under the Curve), utilizzata come misura della bontà del test, risulta essere pari a 0.728, con una significatività  $p=0.007$ . In un secondo set di 106 campioni, che includevano 28 casi italiani e 78 casi ottenuti dall' istituto di Patologia di Locarno (Svizzera) la metilazione del promotore di  $\beta 4\text{GalT1}$  è stata osservata nel 49% dei casi (52/106). Non è stata inoltre rilevata nessuna correlazione statisticamente significativa tra lo stato di metilazione di  $\beta 4\text{GalT1}$  e caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti.

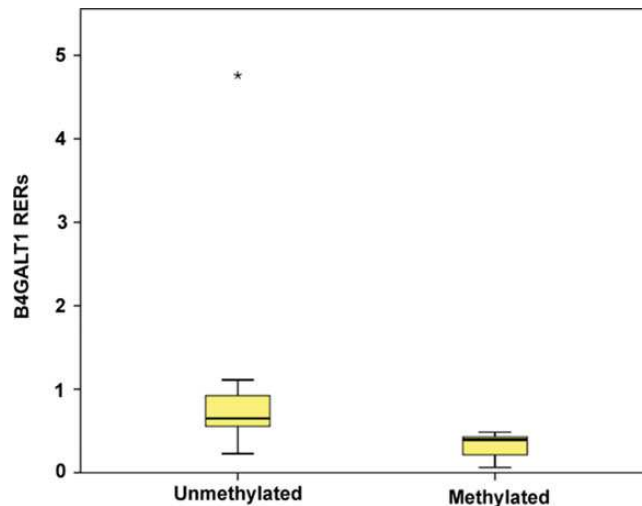


**Figura 14:** Curva ROC per  $\beta 4\text{GalT1}$  ha permesso di identificare il *cut-off* ottimale (2.07) per massimizzare la sensibilità e la specificità del saggio.

#### **4.2 Correlazione tra lo stato di metilazione di $\beta 4\text{GalT1}$ e i livelli di mRNA e Proteina nelle neoplasie colon-rettali:**

Per verificare se lo stato di ipermetilazione di  $\beta 4\text{GalT1}$  determinata una ridotta espressione dei livelli di mRNA abbiamo effettuato un'analisi di espressione dell'RNA messaggero in un gruppo di 19 pazienti, includendo tumori e

corrispondente tessuto normale. Sono infatti stati scelti 9 campioni con ipermetilazione di  $\beta$ 4GalT1 e 10 casi che non presentavano metilazione. E' stata dimostrata una correlazione inversa statisticamente significativa tra livelli di metilazione e di espressione ( Figura 15; Correlazione di Pearson:  $r = 0.482$ ,  $P = 0.037$ ).

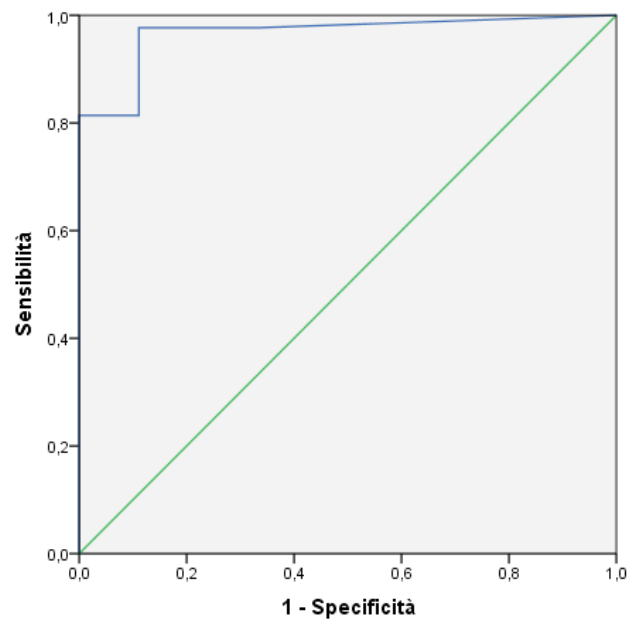


**Figura 15:** Analisi di espressione dell'RNA messaggero in un gruppo di 9 campioni con ipermetilazione di  $\beta$ 4GalT1 e 10 casi che non presentavano metilazione. (Correlazione di Pearson:  $r = 0.482$ ,  $P = 0.037$ ).

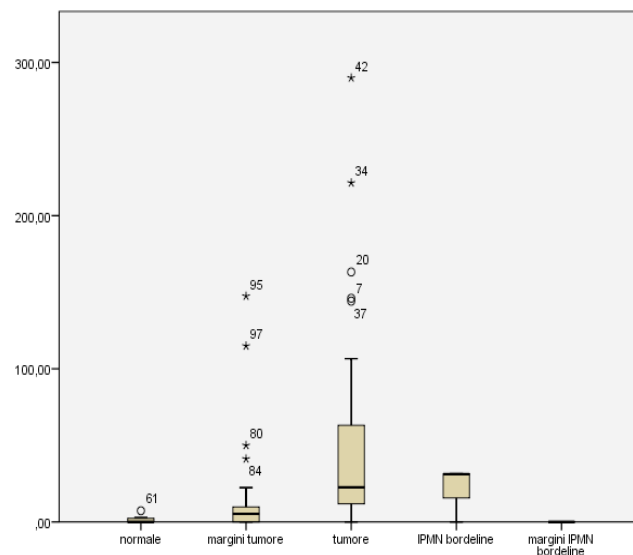
#### 4.3 Analisi di metilazione dei geni KIF1A nell'adenocarcinoma pancreatico.

In relazione allo screening iniziale (figura 10) nell'ambito dei geni metilati in maniera tumore-specifica nell'adenocarcinoma pancreatico ho focalizzato la mia attenzione sul seguente gene KIF1A che presenta un' elevata frequenza di metilazione e che è stato analizzato mediante QMSP. L'analisi di metilazione è stata infatti condotta in 53 casi inclusi in paraffina di adenocarcinoma pancreatico e corrispondente tessuto sano perilesionale, 7 campioni di Neoplasie Intraduttali Papillari Mucinosi (IPMN) e relativi margini perilesionali, 10 campioni di parenchima normale derivato da casi con pancreatite. L'analisi della curva ROC (AUC 0.96,  $p=0.001$ ) (Figura 16) ha infatti permesso di stabilire il *cut-off* (7.3) ottimale cui corrispondono il miglior valore di sensibilità e specificità. Il gene KIF1A è risultato essere non metilato nei controlli non neoplastici, e metilato nell'81% degli adenocarcinomi pancreatici. Inoltre la metilazione è risultata essere presente anche nelle lesioni preneoplastiche di

IPMN, suggerendo un ruolo della metilazione di KIF1A già nelle fasi precoci e nei margini morfologicamente sani dei pazienti con adenocarcinoma (Figura 17).



**Figura 16:** Curva ROC per KIF1A. AUC 0.96,  $p=0.001$ , *cut-off* (7.03) ottimale per massimizzare la sensibilità e la specificità del saggio.



**Figura 17:** Mann-Whitney U per il gene KIF1A che risulta metilato nell'81% degli adenocarcinomi pancreatici, nelle lesioni preneoplastiche di IPMN e nei margini morfologicamente sani di pazienti con adenocarcinoma.

## 5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel presente studio viene dimostrato il coinvolgimento delle alterazioni epigenetiche del gene  $\beta 4\text{GalT1}$  nei tumori del colon e del gene  $\text{KIF1A}$  nei tumori del pancreas. I precedenti studi sulla metilazione genica tumorale si erano focalizzati su geni già noti per avere un ruolo nel cancro o perché una loro inattivazione per metilazione del promotore era stata già osservata in altri istotipi tumorali. Ciò che si è dimostrato con il “Progetto Metiloma” è che la metilazione si verifica sia in modalità tumore-specifica, che in modalità tessuto-specifica:  $\beta 4\text{GalT1}$  è metilato non solo nel tumore del colon, ma anche in altre neoplasie, come tumori del polmone, dell’esofago e della prostata. Invece il gene  $\text{KIF1A}$  è risultato essere metilato in maniera significativa (75%) nel tumore del pancreas ma anche in altri tumori come neoplasie polmonari e nasofaringee .

Diversi marcatori molecolari vengono continuamente proposti per una miglior definizione della diagnosi e della prognosi nel carcinoma del colon retto e del pancreas, ma la loro reale utilità rimane controversa spesso per la loro scarsa sensibilità e specificità. Il primo step nella pipeline di discovery di nuovi biomarcatori di screening richiede infatti uno studio del nuovo target nei tessuti tumorali e in quelli non tumorali per la definizione dei suddetti parametri. Inoltre laddove è possibile ovviare ad una bassa sensibilità di un singolo biomarker con l’utilizzo di un pannello di più marcatori, la specificità rimane un aspetto prioritario come raccomandato dalle linee guida dell’EDNR (Early Detection Research Network). Pertanto alla luce dei risultati ottenuti i marcatori epigenetici di  $\beta 4\text{GalT1}$  e  $\text{KIF1A}$  rispettivamente ipermetilati in modo significativo nei tumori del colon e del pancreas, in funzione della loro elevata sensibilità e specificità possono essere considerati del “candidate biomarkes” ottimali per lo studio di queste neoplasie e in particolare per ulteriori studi che ne permettano di definire il ruolo nella diagnosi precoce (screening) e nel follow-up (marcatori dei ripresa di malattia) da utilizzare sia nel tessuto che nel sangue di pazienti che hanno già avuto diagnosi di malattia neoplastica.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- 1) Rebecca Siegel et al, cancer statistics 2013. *CA Cancer J Clin* 2013;63:11–30
- 2) Bosetti C, Bertuccio P, Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Cancer mortality in the European Union, 1970-2003, with a joinpoint analysis. *Ann Oncol* 2008; 19:631-640
- 3) Robbins & Cotran. *Le basi patologiche delle malattie*, VIII edizione 2010
- 4) Wahi MM, Shah N, Schrock CE, Rosemurgy AS, Goldin SB. Reproductive factors and risk of pancreatic cancer in women: a review of the literature. *Ann Epidemiol* 2009; 19:103-11
- 5) Ginde AA, Liu MC, Camargo CAJ. Demographic differences and trends of vitamin D insufficiency in the US population, 1988-2004. *Arch Intern Med* 2009; 169:626-32
- 6) Kinoshita S, Wagatsuma Y, Okada M. Geographical distribution for malignant neoplasm of the pancreas in relation to selected climatic factors in Japan. *Int J Health Geogr* 2007; 6:34.
- 7) Giovannucci E, Liu Y, Rimm EB, Hollis BW, Fuchs CS, Stampfer MJ, Willett WC. Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:451-9;
- 8) Grant WB, Mohr SB. Ecological Studies of Ultraviolet B, Vitamin D And Cancer Since 2000. *Ann Epidemiol* 2009; 19(7):446-54.
- 9) Edge, S et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. New York: Springer – Verlag; 2010.
- 10) Daniels IR et al. Accurate staging, selective preoperative therapy and optimal surgery improves outcome in rectal cancer: a review of the recent evidence. *Colorectal Dis*. 2007; 9: 290-301.
- 11) Snady H & Merrick MA. Improving the treatment of Colorectal cancer: The Role of EUS. *Cancer Investigation*. 1998. 16: 572-81
- 12) NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology – 2013. [www.nccn.org](http://www.nccn.org)
- 13) Bartram C et al. Endorectal Ultrasound and Magnetic Resonance Imaging in Rectal Cancer Staging. *Gastroenterol Clin North Am*. 2002; 31: 827-39
- 14) <http://www.cap.org/apps/cap.portal>. January 2014

- 15) Hamilton SR, Aaltonen LA (editors). Carcinoma of the colon and rectum. In: World Health Organization Classification of Tumours "Pathology and genetics of tumors of the digestive system" 2000: IARC Press, Lyon 105-119
- 16) Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol* 2003; 16:376-88
- 17) The Royal College of Pathologists. Dataset for Colorectal Cancer (2nd Edition) 2007; 1-27
- 18) Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007; 50:113-30
- 19) Lanza G, Gafa R, Matteuzzi M, Santini A. Medullary-type poorly differentiated adenocarcinoma of the large bowel: a distinct clinicopathologic entity characterized by microsatellite instability and improved survival. *J Clin Oncol* 1999; 17:2429-38
- 20) Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, Walsh-Vockley C, Petersen GM, Walsh MD, Leggett BA, Young JP, Barker MA, Jass JR, Hopper J, Gallinger S, Bapat B, Redston M, Thibodeau SN. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 2002; 20:1043-8
- 21) Ogino S, Goel A. Molecular Classification and Correlates in Colorectal Cancer. *J Mol Diagn* 2008; 10:13-27
- 22) Boland CR, Koi M, Chang DK, Carethers JM. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immuno-histochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer* 2008; 7:41-52
- 23) Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 2008; 29:673-80
- 24) Snover DC, Jass JR, Fenoglio-Preiser C, Batts KP. Serrated polyps of the large intestine: a morphologic and molecular review of an evolving concept. *Am J Clin Pathol* 2005; 124:380-91
- 25) O'Brien MJ. Hyperplastic and serrated polyps of the colorectum. *Gastroenterol Clin N Am* 2007; 36:947-968
- 26) Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, Kang GH, Widschwendter M, Weener D, Buchanan D, Koh H, Simms L, Barker M, Leggett B, Levine J, Kim M, French AJ, Thibodeau SN, Jass J, Haile R, Laird PW. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006; 38:787-93



- 27) Ferracin M, Gafa R, Miotto E, Veronese A, Pultrone C, Sabbioni S, Lanza G, Negrini M. The methylator phenotype in microsatellite stable colorectal cancers is characterized by a distinct gene expression profile. *J Pathol* 2008; 214:594-602.
- 28) Sobin LH, Wittekind CH (editors). *TNM classification of malignant tumours. Sixth Edition 2002: Wiley-Liss, New York*
- 29) Cooper HS. Pathology of the endoscopically removed malignant colorectal polyp. *Curr Diagn Pathol* 2007; 13:423-437
- 30) Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Aida S, Hase K, Matsukuma S, Kanai T, Kurihara H, Ozawa K, Yoshimura K, Bekku S. Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127:385-94
- 31) Quirke P, Williams GT, Ectors N, Ensari A, Piard F, Nagtegaal I. The future of the TNM staging system in colorectal cancer: time for a debate? *Lancet Oncol* 2007; 8:51-7
- 32) Murphy J, Pocard M, Jass JR, O'Sullivan GC, Lee G, Talbot IC. Number and size of lymph nodes recovered from dukes B rectal cancers: correlation with prognosis and histologic antitumor immune response. *Dis Colon Rectum* 2007; 50:1526-34
- 33) Cserni G. Nodal staging of colorectal carcinomas and sentinel nodes. *J Clin Pathol* 2003; 56:327-35
- 34) Morris EJ, Maughan NJ, Forman D, Quirke P. Identifying stage III colorectal cancer patients: the influence of the patient, surgeon, and pathologist. *J Clin Oncol* 2007; 25:2573-9
- 35) Rosenberg R, Friederichs J, Schuster T et al. Prognosis of patients with colorectal cancer is associated with lymph node ratio. A single-center analysis of 3026 patients over a 25-year time period. *Ann Surg* 2008; 248(6):968-978
- 36) O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:1420-5
- 37) Rodel C, Martus P, Papadoupolos T, Fuzesi L, Klimpfinger M, Fietkau R, Liersch T, Hohenberger W, Raab R, Sauer R, Wittekind C. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:8688-96
- 38) Ryan R, Gibbons D, Hyland JM, Treanor D, White A, Mulcahy HE, O'Donoghue DP, Moriarty M, Fennelly D, Sheahan K. Pathological response following long-

course neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Histopathology* 2005; 47:141-6

39) Nagtegaal ID, Quirke P. What is the role for the circumferential margin in the modern treatment of rectal cancer? *J Clin Oncol* 2008; 26:303-12

40) Hruban RH, Pitman MB, Davd S, Klimstra MD. Tumors of the pancreas. *AFIP Atlas of Tumor Pathology. Fourth series, fascicle 6* 2007; Washington, D.C. American Registry of Pathology in collaboration with the Armed Forces Institute of Pathology

41) Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ et al. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 2006; 20:1218-49

42) Chen B, Wang L, Hu S et al. Would pancreas duct-epithelium-derived stem/progenitor cells enhance islet allograft survival by means of islets recruitment and tolerance induction in Edmonton protocol era? *Med Hypotheses* 2008; 70:661-4

43) Zhao M, Amiel SA, Christie MR et al. Evidence for the presence of stem cell-like progenitor cells in human adult pancreas. *J Endocrinol* 2007; 195:407-14

44) Brand RE, Lynch HT. Genotype/phenotype of familial pancreatic cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2006; 35:405-15

45) Shi C, Hruban RH, Klein AP. Familial pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133:365-74

46) Hruban RH, Pitman MB, Davd S, Klimstra MD. Tumors of the pancreas. *AFIP Atlas of Tumor Pathology. Fourth series, fascicle 6* 2007; Washington, D.C. American Registry of Pathology in collaboration with the Armed Forces Institute of Pathology

47) Klöppel G, Solcia E, Longnecker D et al. *Histological typing of tumours of the exocrine pancreas.* Berlin, Springer-Verlag, 1996

48) Lüttges J, Zamboni G, Longnecker D et al. The immunohistochemical mucin expression pattern distinguishes different types of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas and determines their relationship to mucinous noncystic carcinoma and ductal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2001; 25:942-8;

49) Yonezawa S, Horinouchi M, Osako M et al. Gene expression of gastric type mucin (MUC5AC) in pancreatic tumors: its relationship with the biological behavior of the tumor. *Pathol Int* 1999; 49:45-54

50) Swierczynski SL, Maitra A, Abraham SC et al. Analysis of novel tumor markers in pancreatic and biliary carcinomas using tissue microarrays. *Hum Pathol* 2004; 35:357-66

- 51) Ranganathan P, Harsha HC, Pandey A. Molecular alterations in exocrine neoplasms of the pancreas. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133:405-12
- 52) Hruban RH, Takaori K, Canto M et al. Clinical importance of precursor lesions in the pancreas. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2007; 14:255-63
- 53) Ottenhof NA, Milne AN, Morsink FH et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic tumorigenesis: of mice and men. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133:375-81
- 54) Adsay NV, Merati K, Basturk O et al. Pathologically and biologically distinct types of epithelium in intraductal papillary mucinous neoplasms: delineation of an "intestinal" pathway of carcinogenesis in the pancreas. *Am J Surg Pathol* 2004; 28:839-48
- 55) Basturk O, Coban I, Adsay NV. Pancreatic cysts: pathologic classification, differential diagnosis, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133:423-38
- 56) Adsay N, Adair C, Heffes C et al. Oncocytic papillary mucinous cystic tumor of the pancreas. *Am J Surg Pathol* 1996; 20:980-94
- 57) Sato N, Rosty C, Jansen M et al. STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene inactivation in intraductal papillary- mucinous neoplasms of the pancreas. *Am J Pathol* 2001; 159:2017-22
- 58) Zamboni G, Scarpa A, Bogina G et al. Mucinous cystic tumors of the pancreas: clinicopathological features, prognosis, and relationship to other mucinous cystic tumors. *Am J Surg Pathol* 1999; 23:410-22
- 59) Singh M, Maitra A. Precursor lesions of pancreatic cancer: molecular pathology and clinical implications. *Pancreatology* 2007; 7:9-19
- 60) Fukushima N, Sato N, Prasad N et al. Characterization of gene expression in mucinous cystic neoplasms of the pancreas using oligonucleotide microarrays. *Oncogene* 2004; 23:9042-51
- 61) Klimstra D, Rosai J, Heffess C. Mixed acinar-endocrine carcinomas of the pancreas. *Am J Surg Pathol* 1994; 18:765-78
- 62) Hruban RH, Adsay NV. Molecular classification of neoplasms of the pancreas. *Hum Pathol* 2009; 40:612-23
- 63) Abraham SC, Wu TT, Klimstra DS et al. Distinctive molecular genetic alterations in sporadic and familial adenomatous polyposis-associated pancreatoblastomas:

frequent alterations in the APC/beta-catenin pathway and chromosome 11p. *Am J Pathol* 2001; 159:1619-27

64) Mohr VH, Vortmeyer AO, Zhuang Z et al. Histopathology and molecular genetics of multiple cysts and microcystic (serous) adenomas of the pancreas in von Hippel-Lindau patients. *Am J Pathol* 2000; 157:1615-21

65) Moore PS, Zamboni G, Brighenti A et al. Molecular characterization of pancreatic serous microcystic adenomas: evidence for a tumor suppressor gene on chromosome 10q. *Am J Pathol* 2001; 158:317-21

66) Thirabanjasak D, Basturk O, Altinel D et al. Is serous cystadenoma of the pancreas a model of clear-cell-associated angiogenesis and tumorigenesis? *Pancreatol* 2009; 9:182-8

67) Lüttges J, Vogel I, Menke M et al. The retroperitoneal resection margin and vessel involvement are important factors determining survival after pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the head of the pancreas. *Virchows Arch* 1998; 433:237-42

68) Cohen AM. Surgical Consideration in patients with cancer of the Colon and the Rectum. *SeminOncol.* 1991; 18: 381-87.

69) Aranha O et al. Adjuvant therapy for Colon Cancer. *CurrGastr Reports.* 2007; 9: 415 – 21

70) Benson III AB. New approaches to Assessing and Treating Early-Stage Colon and Rectal Cancer: Cooperative Group Strategies for Assessing optimal Approaches in Early – Stage Disease. *Clin Cancer Res.* 2007; 13 (22 Suppl): 6871s-75s.

71) Grothey A. Targeted Agents in Early – Stage Colon Cancer. *Clin Cancer Res.* 2007; 13 (22 Suppl): 6910s-12s.

72) NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology – Rectal Cancer – V.I. 2008. [www.nccn.org](http://www.nccn.org)

73) Buchler MW, Wagner M, Schmied BM, Uhl W, Friess H, Z'Graggen K. Changes in morbidity after pancreatic resection: toward the end of completion pancreatectomy. *Arch Surg* 2003; 138:1310-1314

74) Bogoevski D, Strate T, Yekebas EF, Izbicki JR. Pancreatic cancer: a generalized disease--prognostic impact of cancer cell dissemination. *Langenbecks. Arch Surg* 2008 Nov; 393(6):911-7

75) Koliopanos A, Avgerinos C, Farfaras A, Manes C, Dervenis C. Radical resection of pancreatic cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008 Feb; 7(1):11-8

- 76) Hart AR, Kennedy H, Harvey I. Pancreatic cancer: a review of the evidence on causation. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6(3):275-82
- 77) Sultana A, Smith CT, Cunningham D, Starling N, Neoptolemos JP, Ghaneh P. Meta-Analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2007 Jun; 25(18):2607-15
- 78) Khanna A, Walker GR, Livingstone AS, Arheart KL, Rocha-Lima C, Koniaris LG. Is adjuvant 5-FU based chemoradiotherapy for resectable pancreatic adenocarcinoma beneficial? A meta-analysis of an unanswered question. *J Gastrointest Surg* 2006 May; 10(5):689-97
- 79) Stocken DD, Büchler MW, Dervenis C, Bassi C, Jeekel H, Klinkenbijn JH, Bakkevold KE, Takada T, Amano H, Neoptolemos JP, Pancreatic Cancer Meta-analysis Group. Meta-analysis of randomised adjuvant therapy trials for pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2005 Apr 25; 92(8):1372-81
- 80) Breslin TM, Hess KR, Harbison DB, Jean ME, Cleary KR, Dackiw AP, Wolff RA, Abbruzzese JL, Janjan NA, Crane CH, Vauthey JN, Lee JE, Pisters PW, Evans DB. Neoadjuvant chemoradiotherapy for adenocarcinoma of the pancreas: treatment variables and survival duration. *Ann Surg Oncol* 2001 Mar; 8(2):123-32
- 81) Rodriguez-Moranta F et al. Postoperative surveillance in patients after colorectal cancer surgery: a prospective, multicenter, randomized, controlled trial. *J ClinOncol.* 2006; 24: 386-93
- 82) Sargent DJ et al. Disease-free survival versus overall survival as a primary end-point for adjuvant colon cancer studies: individual patient data from 20,898 patients on 18 randomized trials. *J ClinOncol.* 2005; 23: 8664-8670.
- 83) Fakin MG. CEA Monitoring in Colorectal Cancer. What You Should Know. *Oncology.* 2006; 20: 579-601
- 84) Locker GY et al. ASCO 2006 Update of Recommendation for the Use of Tumor Markers in Gastrointestinal Cancer. *J ClinOnc.* 2006; 20: 5313-27
- 85) Duffy MJ et al. Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *European journal of cancer.* 2007; 43: 1348-60
- 86) Simmonds PC et al. Surgical resection of hepatic metastases from colorectal cancer: a systematic review of published studies. *Br J Cancer.* 2006; 94: 982–99.
- 87) Levenson V.V. Biomarkers: diagnostics highlights and surrogate end points. *Pharmacogenomics* 2004;5:459-461.

- 88) Laird. PW. The Power and the Promise of DNA Methylation Markers. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3: 253, 66.
- 89) Etzioni R et al. The Case for Early Detection. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3: 1-10.
- 90) Srivastava S. & Kramer B.S. Early detection cancer research network [editorial]. *Lab Invest*. 2000;80:1147-1148.
- 91) Pepe M.S. et al. Phases of biomarker development for early detection. *J. Natl. Cancer Inst.*2001; 14:1054 1061.
- 92) Khair G et al. Epithelial Molecular Markers in the Peripheral Blood of Patients with Colorectal Cancer. *Dis Colon Rectum*. 2007; 50: 1188-203
- 93) Zhou ZW. et al. Detection of lymph nodes micrometastases in Duke's A and B colorectal cancer using anti-cytokeratine antibodies AE1/AE3. *World J Gastroenterology*. 2005; 11: 3640-43.
- 94) Arnold CN et al. Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Cancer*. 2005; 104: 2035-47
- 95) Fearon ER e Vogelstein B. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell*. 1990; 61: 759-67.
- 96) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70
- 97) Grothey A. Targeted Agents in Early – Stage Colon Cancer. *Clin Cancer Res*. 2007; 13 (22 Suppl): 6910s-12s.
- 98) Fearon ER, Hamilton SR Vogelstein B. Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science*. 1987; 238: 193-7.
- 99) NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology – Colon Cancer Screening – V.I. 2008. [www.nccn.org](http://www.nccn.org)
- 100) Grady WM & Markowitz SD. Genetic and Epigenetic Alteration in Colon Cancer. *Annu Rev Hum Genet*. 2002; 3: 101-28
- 101) Engeland M. et al. K-Ras Mutation and RASSF1A promoter methylation in Colorectal Cancer. *Oncogene*. 2002, 21: 3792-95
- 102) Vogelstein B et al. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000; 408: 307-10
- 103) Sherr C.J., Weber J.D. The ARF/p53 pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 2000;10: 94-9

- 104) Poeta M. L. TP53 Mutations and Survival In Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med.* 2007 Dec. 20, 357: 2552-61.
- 105) Lanza G, Gafa R, Santini A, et al. Immunohistochemical test for MLH1 and MSH2 expression predicts clinical outcome in stage II and III colorectal cancer patients. *J Clin Oncology.* 2006;24: 2359–2367.
- 106) Feinberg A.P. & Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature.* 1983 Jan 6, 301: 89-92
- 107) Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet.* 2006 Jan;7(1):21-33
- 108) Pardal R et al. Applying the principles of Stem-Cell Biology to Cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 895- 902
- 109) Li HC et al. Stem Cell and cancer: Evidence for bone marrow stem cells in epithelial cancers. *World J Gastroenterol.* 2006; 12: 363-71
- 110) Esteller M. Epigenetics in Cancer. *New Engl J Med.* 2008, 358: 1148-59
- 111) Seligson DB et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature* 2005; 435: 1262-6
- 112) Chang-Zheng C. MicroRNA as Oncogene and TumorSupressors. *N Engl J Med.* 2005; 353: 1768-71
- 113) Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Cancer Rew.* 2004; 4: 988-93.
- 114) Mulero-Navarro S, Esteller M. Epigenetic biomarkers for human cancer: The time is now. *Crit Rev Oncol/Hematol.* 2008; doi:10.1016/j.critrevonc.2008.03.001
- 115) Schuebel k et al. Comparing the DNA Hypermethylome with Gene Mutation in Human Colorectal Cancer. *PLOS Genetics.* 2007 Sep, 3(9): 1709-23

---