

Marcatori sierici e tissutali di miopatia nei pazienti con tumore del colon-retto al momento della diagnosi

Nicoletta Adami

Department of Biomedical Sciences, University of Padova, Italy

Abstract

Serum and tissue markers of myopathy in patients with colorectal cancer

Skeletal muscles in patients with cancer undergo many changes due to immuno-inflammatory factors of tumor origin, or to chemotherapy and irradiation. Aim of the present study is to identify serological biomarkers and early myopathic features in skeletal muscle biopsies from weight stable patients bearing colorectal cancer at the onset of disease. Morphometric analyses by histochemistry and immunohistochemistry were performed on intraoperative muscle biopsies from patients with early colorectal cancer and from weight stable patients undergoing surgery for benign non-inflammatory conditions. Serological analyses for testing markers of inflammation (C Reactive Protein, CRP), muscle enzymes, (Creatin Kinase, CK), soluble isoforms of adhesion molecules (Neural Cell Adhesion Molecule, NCAM), and a marker of protein turnover (prealbumin, a typical indicator of caloric and protein malnutrition) were also performed. Fifty oncologic patients (28 male/22 female) and 25 non oncologic patients (18 male/7 female) (p=N.S.) were studied. In muscles from cancer patients we observed a subclinical myopathy characterized by an abnormal distribution of myonuclei. The percentage of myofibers with internalized nuclei was significantly higher in oncologic (median= 13.1%, IQR= 6.0-20.3) than in non oncologic patients (median= 3%, IQR= 2.5-6.1) (p<0.0001). The frequency of these internally nucleated myofibers is even higher in a subgroup of oncologic patients taking myotoxic drugs. In cancer patients, we observed an inverse correlation between the number of internally nucleated fibers and the presence of node metastasis (N+) (ρ)=-0.30 (p=0.03). Moreover, in patients with colorectal cancer, low serum levels of preoperative prealbumin (median= 167,7 mg/L, normal range 200-400 mg/L), were detected. The link between the observed early myopathy and long-term cachexia is supported also by the altered expression of sarcolemma associated proteins, in particular laminin and dystrophin. Patients affected with colorectal cancer at disease onset display low pre surgical serum levels of prealbumin (also known as transtiretin) and regenerating myofibers in the rectus abdominis muscle. The myopathy appears to be associated with an early stage of cancer and it could be interpreted as a consequence on the skeletal muscle of anti-cancer defense mechanisms (pro-apoptotic, thus non inflammatory), during the pre-invasive stage of the neoplasia. A comprehensive study on the potential molecular mechanisms that are responsible for this cancer-associated myopathy could possibly provide new diagnostic and prognostic biomarkers and new therapeutic targets to prevent the severe loss of muscle tissue which characterizes late-onset cancer cachexia.

Key Words: serum and tissue markers, myopathy, colorectal cancer at the onset

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (3): 125-146

Sommario

Nei pazienti affetti da neoplasia il muscolo scheletrico può presentare alterazioni causate da fattori infiammatori ed immunologici di origine tumorale o connessi con la chemioterapia o la radioterapia. Lo stadio più grave di queste alterazioni, ad esordio

tardivo, è la sindrome cachettica. Scopo di questo studio è invece la ricerca di marcatori sierologici che accompagnino la presenza nelle biopsie muscolari di pazienti con neoplasia del colon retto all'esordio (in assenza di sintomi di miopatia o di cachexia) di alterazioni miopatiche precoci, da utilizzare come nuovi biomarcatori umorali e tissutali diagnostici e/o

Serum and tissue markers in colorectal cancer at onset

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (3): 125-146

prognostici. Abbiamo eseguito studi morfometrici, saggi istochimici ed immunostochimici in biopsie del muscolo retto dell'addome di pazienti affetti da neoplasia coloretale e, come controlli, di pazienti non oncologici e normopeso sottoposti a intervento chirurgico per condizioni benigne non infiammatorie. A queste analisi sono stati affiancati dosaggi su siero di marcatori di flogosi, la Proteina C Reattiva (PCR), di enzimi muscolari, la Creatina Chinasi (CK), dell'isoforma solubile della Molecola di adesione neuronale (Neural Cell Adhesion Molecule, NCAM) e di un indicatore di turnover proteico (transtiretina o prealbumina), tipico della malnutrizione calorico-proteica. I dati biotici sono stati correlati con le caratteristiche cliniche e biomorali dei pazienti, con il tipo e la durata dell'intervento e con i dati anatomopatologici delle neoplasie asportate. Sono stati studiati 50 pazienti (28 maschi/22 femmine) sottoposti a resezione coloretale per neoplasia del colon retto e 25 pazienti non neoplastici (18 maschi/7 femmine) (p=N.S.) sottoposti a interventi chirurgici per patologie benigne non infiammatorie. Nelle biopsie muscolari dei pazienti affetti da neoplasia abbiamo osservato una miopatia subclinica caratterizzata da una distribuzione anomala dei mionuclei, localizzati all'interno della fibra muscolare e non nella loro fisiologica sede periferica e la presenza di fibre rigeneranti. Non sono invece osservabili fibre degenerate o francamente necrotiche, né cospicui infiltrati infiammatori. La percentuale di fibre con nuclei internalizzati è significativamente più elevata nei pazienti portatori di neoplasia (mediana= 13,1%, IQR= 6.0-20.3) rispetto ai

pazienti non-neoplastici (mediana= 3%, IQR= 2.5-6.1) ($p<0.0001$). La frequenza di tali fibre raggiunge i valori massimi nel sottogruppo di pazienti neoplastici trattati con farmaci mitotossici, anche se i valori medi complessivi non sono significativamente diversi nei soggetti con sola neoplasia. Nei pazienti oncologici abbiamo inoltre osservato una correlazione inversa tra la percentuale di fibre con nuclei internalizzati e la presenza di metastasi linfonodali (N+) ($\rho=-0.30$) ($p=0.03$). Di particolare interesse è la presenza preoperatoria solo nei pazienti portatori di adenocarcinoma coloretale all'esordio di valori inferiori (mediana = 167,7 mg/L) alla norma (200-400 mg/L) della prealbumina, un marcatore tipico della malnutrizione calorico-proteica e già descritto in condizioni in cui sussistono deficit proteici per ridotto apporto con la dieta, cattivo assorbimento (enteropatie, celiachia) o aumentato catabolismo (neoplasie, stati febbrili, cachessia, AIDS, ipertiroidismo, ipercortisolismo). Il legame tra la miopatia da noi rilevata e la cachessia è rafforzato anche dal riscontro di alterazioni nella distribuzione di proteine del sarcolemma, nello specifico laminina e distrofina.

I pazienti con neoplasia coloretale all'esordio presentano in fase preoperatoria valori inferiori alla norma di prealbumina ed una miopatia precoce caratterizzata da fibre con nuclei internalizzati e segni di rigenerazione delle fibre del muscolo retto dell'addome. Tale miopatia è correlata ad uno stadio precoce di malattia e può essere interpretata come una risposta secondaria del tessuto muscolare scheletrico a meccanismi difensivi anti-neoplastici (pro-apoptotici) e quindi non-infiammatori nelle fasi preinvasive della neoplasia, suggerendo un loro impiego clinico coordinato come biomarcatori diagnostici precoci e/o prognostici di neoplasia pre-infiltrativa. Uno studio più dettagliato del potenziale coinvolgimento della morte cellulare per apoptosi nello sviluppo di questa miopatia, associata a neoplasia all'esordio, verrà condotto sia a livello tissutale che sierologico, allo scopo di identificare ulteriori biomarcatori utili nei programmi di screening del cancro colo rettale.

Indice

- 1.1. Il cancro del colon retto
- 1.2. La cachessie neoplastica
- 1.3. Altre alterazioni del muscolo scheletrico in oncologia
- 1.4. Metabolismo nel cancro del colon retto
- 1.5. Il muscolo scheletrico
 - 1.5.1. Microscopia elettronica
 - 1.5.2. Istochimica
 - 1.5.3. Fibre di tipo I
 - 1.5.4. Fibre di tipo II
 - 1.5.5. Plasticità del muscolo scheletrico
 - 1.5.6. Rigenerazione muscolare
 - 1.5.7. Il complesso Distrofina-Glicoproteine
 - 1.5.8. Miopatie, miositi paraneoplastiche



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE
IN PATOLOGIA CLINICA**

**TESI DI SPECIALIZZAZIONE
MARCATORI SIEROLOGICI E TESSUTALI DI
MIOPATIA SUBLINICA IN NEOPLASIA DEL
COLON RETTO ALL'ESORDIO CLINICO**

Relatore: Ch.mo Prof. Aldo Baritussio
Correlatori: Dr.ssa Sandra Zampieri
Ch.mo Prof. Ugo Carraro

Specializzanda: Dott.ssa Adami Nicoletta

Anno Accademico 2011-2012

Serum and tissue markers in colorectal cancer at onset

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (3): 125-146

2. Obiettivi dello studio
3. Materiali e Metodi
 - 3.1. Pazienti
 - 3.2. Biopsie muscolari
 - 3.3. Analisi morfologiche su sezioni criostatiche seriali
 - 3.3.1 Analisi istologiche
 - 3.3.2 Analisi istochimiche
 - 3.3.3 Analisi immunohistochimiche
 - 3.3.3.1 Espressione di marcatori di rigenerazione
 - 3.3.3.2 Espressione di proteine del sarcolemma
 - 3.3.3.3 Distribuzione di cellule mono-nucleari
 - 3.3.4 Morfometria
 - 3.4. Analisi sierologiche
 - 3.4.1 Analisi immunoenzimatiche
 - 3.4.2 Analisi immunonefelometriche
 - 3.4.3 Analisi immunofotometriche
 - 3.5. Dati operatori ed anatomopatologici oncologici
 - 3.6. Analisi statistiche
4. Risultati
5. Discussione
6. Conclusioni e sviluppi futuri

1.1 Il cancro del colon retto

Il cancro coloretale è la terza neoplasia più frequente al mondo, conta ogni anno circa un milione di nuovi casi e 500.000 morti ad essa associate. In Europa e negli Stati Uniti rappresenta una delle prime cause di morte per cancro [35]. Circa il 50% dei pazienti affetti da neoplasia coloretale sviluppa una recidiva o ha un esito infausto entro 5 anni dalla diagnosi [5, 38,42]. Una delle più gravi complicanze della malattia neoplastica, in particolare del tratto gastroenterico, è la cachessia tumorale, che si manifesta in più dell'80% dei pazienti con neoplasia avanzata e si associa a una aumentata morbilità e mortalità [22]. Gli attuali programmi di screening del cancro del colon retto portano alla diagnosi di neoplasie ad uno stadio molto precoce, con pazienti asintomatici, normopeso o con scarso calo ponderale e senza altri segni di patologie extracoliche. L'associazione tra cancro e miopatia è nota soprattutto nelle fasi tardive della malattia neoplastica, quando sindromi miopatiche possono essere indotte dalle terapie antineoplastiche radio o farmacologiche, o dalla diffusione metastatica del tumore. La produzione scientifica a tale riguardo è soprattutto basata su modelli sperimentali nei roditori o è basata su assunti biochimici noti; dibattuti rimangono i meccanismi che determinano le miopatie infiammatorie cancro correlate così come le alterazioni che conducono alla cachessia neoplastica. A nostra conoscenza, inoltre, non sono a tutt'oggi presenti pubblicazioni cliniche sullo studio delle alterazioni cui il muscolo scheletrico va incontro nella fase precoce di sviluppo di una neoplasia. Le neoplasie coloretali sono la maggior preoccupazione medica in tutto il mondo ed hanno un considerevole impatto sui costi della sanità, sia per il monitoraggio dei pazienti sia soprattutto per il trattamento dei tumori invasivi [38]. Molteplici

alterazioni molecolari e genetiche sottendono lo sviluppo e la progressione delle neoplasie del colon retto. La maggior parte di esse si presentano sporadicamente a causa di mutazioni somatiche multiple e di instabilità genetica. Esistono poi forme ereditarie come la Poliposi Familiare e la sindrome di Lynch; e le neoplasie associate alle malattie infiammatorie croniche (Morbo di Crohn e Rettocolite ulcerosa). L'instabilità genetica include l'instabilità cromosomica e l'instabilità dei microsatelliti, che è osservata nella maggior parte delle neoplasie coloretali ereditarie non poliposiche e solo in una piccola porzione di quelle sporadiche. La maggior parte dei tumori sporadici (circa l'85%), infatti, presenta una instabilità cromosomica, con perdita dell'eterozigosi, amplificazione e traslocazioni geniche, che concorrono all'aneuploidia. I rimanenti casi sono invece associati (15%) ad instabilità dei microsatelliti, con conseguenti mutazioni "frame shift", date dall'alterata capacità del DNA di autoripararsi durante le replicazioni cellulari. Questa modalità sembra associata a fenomeni epigenetici di "gene silencing", da ipermetilazione nelle regioni promoter dei geni implicati nella riparazione del DNA (MLH1, MSH2, MSH6). Fattori di rischio noti sono l'età, il sesso maschile, precedenti polipi o neoplasie del colon retto (anche all'interno della storia familiare), patologie infiammatorie intestinali (es.colite ulcerosa), oltre alla dieta (carne rossa, grassi, scarso apporto di fibre) e allo stile di vita (fumo, alcool, sedentarietà). Tra gli uomini di età compresa tra i 40 ai 79 anni rappresenta la seconda causa di morte dopo il cancro al polmone e nelle donne, della stessa classe di età, la terza [19]. La sopravvivenza per neoplasia coloretale è sostanzialmente aumentata negli anni, grazie sia alla precocità della diagnosi, sia al miglioramento dei trattamenti; la sopravvivenza a 5 anni risulta comunque ancora inferiore al 60% in molti paesi Europei. La colonscopia ha consentito un cambiamento d'intervento in caso di neoplasie coloretali, da precoce identificazione a prevenzione. Essa porta a rimuovere i polipi prima che avvengano i cambiamenti molecolari e prima che le lesioni portino alla soglia della malignità. Lo screening sulla popolazione generale risulta quindi per ora il miglior strumento per la diminuzione della mortalità. Esso è raccomandato a partire dai 50 anni d'età, quando aumenta il rischio di neoplasia colo-rettale [16]. I metodi sono numerosi e con limitazioni peculiari, che riguardano anche i costi associati [16]. Al giorno d'oggi i programmi di screening hanno portato ad un aumento dei polipi cancerizzati asportati con una prevalenza generale di adenocarcinomi asportati endoscopicamente dello 0,8%. Il trattamento ottimale di questi pazienti è ancora dibattuto, non essendo ben definiti tutti i criteri di rischio metastatico di questi polipi cancerizzati. Alcuni criteri associati, risultati però da studi retrospettivi, pongono indicazione alla resezione chirurgica, per

l'alto rischio di metastasi linfonodali o di residuo di malattia [10]. Sia nel caso del cancro sintomatico che nelle neoplasie asintomatiche riscontrate in corso di screening si ha la necessità di definire alcuni criteri prognostici. I biomarcatori prognostici sono associati alla sopravvivenza indipendentemente dal trattamento. La classica sequenza adenoma-carcinoma rimane ancora valida, ma è sempre più appropriata una classificazione fenotipica basata su profili molecolari. Il più importante sviluppo dei marcatori molecolari del cancro coloretale metastatico è stato dato dalla validazione dello stato mutazionale dell'oncogene KRAS per la predittività della risposta alla terapia con anti-EGFR. Altri marcatori promettenti sono la presenza di instabilità dei microsatelliti, associata ad una miglior prognosi rispetto alle neoplasie con microsatelliti stabili; la presenza di una perdita dell'eterozigosi al cromosoma 18q risulta, invece, essere associata ad una prognosi peggiore. I significati prognostici di questa classificazione non sono ancora ben chiari e di conseguenza anche il relativo trattamento clinico. Altri marcatori sono a tutt'oggi oggetto di studio, ma nessuno è stato ancora validato per la pratica clinica [8]. Le vie molecolari della progressione di malattia sono estremamente complesse per cui singoli marcatori sono insufficienti per una corretta definizione dell'efficacia della terapia e della prognosi. La neoplasia colo rettale è, infatti, una patologia eterogenea, soprattutto per quanto riguarda la localizzazione anatomica del tumore, le differenze etniche e le interazioni genetiche e dietetiche che influenzano il suo sviluppo e la sua progressione e che agiscono come fattori di confondimento. Perciò, la ricerca di nuovi biomarcatori dovrebbe concentrarsi nell'identificazione delle differenze individuali basate sullo stadio del tumore, sulla sua localizzazione anatomica, sulla razza; sull'identificazione di molecole (geni, mRNA trascritti e proteine) rilevanti per queste differenze e sullo sviluppo di approcci terapeutici che utilizzino queste molecole nello sviluppo di una medicina personalizzata [38]. Le conoscenze della patogenesi molecolare, dei metodi diagnostici e delle terapie hanno indubbiamente subito notevoli miglioramenti in questi anni, tuttavia, nonostante l'introduzione di nuovi farmaci anche per il trattamento delle neoplasie metastatiche ed un miglioramento dell'overall survival di circa 2 anni, il tasso di cura rimane comunque basso. E' quindi di fondamentale importanza l'individuazione di marcatori molecolari e clinici prognostici e che consentano di "personalizzare" la terapia. La ricerca clinica e traslazionale è l'ambito da cui si spera di avere dati promettenti in questo senso [7]. Recentemente, le isoforme solubili delle molecole di adesione cellulare (in particolare, sICAM-1 e sVCAM-1) sono state individuate come validi fattori prognostici e diagnostici di cancro del colon retto [40]. In particolare, alti livelli sierici di sVCAM sembrano avere un valore

diagnostico di cancro del colon retto, sin dai primi stadi della malattia neoplastica [31,40,41] mentre alti valori sierici di sICAM sarebbero correlati con il potenziale metastatico e quindi dare informazioni prognostiche, permettendo inoltre di differenziare i pazienti che potrebbero beneficiare di una chemioterapia adiuvante [40,41].

1.2 La cachessia neoplastica

Nei pazienti in fase avanzata di malattia tumorale, la perdita severa di tessuto muscolare con o senza perdita di tessuto adiposo caratterizza la sindrome cachettica, fattore prognostico particolarmente sfavorevole e frequente causa di morte in questi soggetti [36]. Le alterazioni associate alla cachessia neoplastica sono anoressia, perdita di peso, perdita di massa muscolare, atrofia muscolare, anemia, alterazione del metabolismo di carboidrati, grassi e proteine. La perdita di tessuto muscolare non coinvolge solamente quello scheletrico ma anche le proteine del miocardio, con conseguente alterata funzionalità cardiaca. La cachessia neoplastica è una sindrome metabolica complessa e, a livello biochimico, sono numerose e diverse le spiegazioni che stanno alla sua base. Nella cachessia si riscontrano alterazioni di tutti i sistemi metabolici, produzione di fattori circolanti in parte prodotti dal tumore, in parte dalle cellule dell'ospite, principalmente macrofagi, in risposta al tumore, e ridotto introito calorico. Talune di queste alterazioni compaiono precocemente durante la storia naturale del tumore. Tra le alterazioni metaboliche determinate dalla presenza del tumore c'è, in particolare, l'aumento del flusso di azoto dal muscolo al fegato. Nel consumo di grassi e di proteine muscolari sono coinvolti sia fattori umorali (citochine) sia tumorali [4]. Il sistema immunitario produce citochine che agiscono su numerose cellule bersaglio come i miociti, epatociti, adipociti, neuroni. Le citochine coinvolte sono principalmente quelle pro-infiammatorie: il Tumor necrosis factor alfa (TNF- α), interleuchina-1 (IL-1), interleuchina-6 (IL-6) e interferone-gamma (IFN- γ). La presenza del tumore determina attraverso vari meccanismi (endotossine da traslocazione batterica; fattori tumorali) una risposta infiammatoria che attiva, tra l'altro, una degradazione proteica muscolare. Tra i fattori coinvolti vengono considerati i peptidi neuroendocrini (neuro peptide Y, galanina), gli ormoni (glucocorticoidi, insulina), il fattore di crescita Insulin-like (IGF-I) ma rivestono un ruolo predominante le citochine. Tra esse un ruolo rilevante sembra essere rivestito dal TNF, ma le complesse alterazioni sembrano essere dovute alla compartecipazione di altre citochine prodotte dal sistema immunitario in risposta a stimoli tumorali. La crescita della neoplasia è invariabilmente associata ad anoressia, con conseguente malnutrizione. L'anoressia sembra essere un effetto più che la causa della cachessia; la cachessia si auto-mantiene e peggiora attraverso l'anoressia. Infatti gli effetti della nutrizione

Serum and tissue markers in colorectal cancer at onset

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (3): 125-146

parenterale sono molto controversi, con aumento ponderale dovuto più alla ritenzione idrica che all'aumento della massa magra. Gli studi metabolici evidenziano alterazioni simili agli stati settici più che ad una malnutrizione o al digiuno. Da un punto di vista metabolico il paziente neoplastico si presenta energeticamente inefficiente, con conseguente perdita di energia, che con l'anoressia ed il diminuito introito calorico, conduce allo stato cachettico. Mentre normalmente il digiuno comporta una caduta del consumo di ossigeno, nel cancro, il diminuito introito calorico non è accompagnato da una diminuzione del consumo di energia, con l'attivazione di cicli futili, energeticamente inefficienti. Il TNF sembra stimolare, per esempio, un turnover proteico caratterizzato da sintesi e degradazione proteica che consuma inutilmente energia; esso inoltre attiva la termogenesi nel grasso bruno attraverso la termogenina (UCP-1) mitocondriale, che dissipa il gradiente protonico della respirazione disaccoppiandolo dalla sintesi di ATP. Recentemente si è scoperta una termogenina specifica del muscolo scheletrico (UCP-3). Il metabolismo lipidico viene alterato da una diminuzione della lipogenesi, con inibizione dell'attività della lipoprotein lipasi (LPL). TNF e IL-1 sembrano inoltre inibire il trasporto del glucosio negli adipociti, con conseguente diminuzione dei substrati della lipogenesi; al contrario aumentano la lipolisi: l'aumento dei lipidi circolanti sembra infatti essere un marker specifico degli stati neoplastici, tale da essere addirittura considerato da alcuni autori come un possibile test di screening. Caratteristica della cachessia è inoltre l'attivazione della risposta di fase acuta. La risposta di fase acuta è una reazione sistemica a vari tipi di danni, come le infezioni, i traumi, la infiammazioni, ed è caratterizzata dalla sintesi di proteine plasmatiche da parte degli epatociti: Proteina C reattiva (PCR), l'Amiloide sierica A (SAA), α 1-antitripsina, fibrinogeno, fattori del complemento e da una diminuzione della prealbumina, dell'albumina, e della transferrina. Questo tipo di risposta è evidenziata in una buona parte dei pazienti con neoplasie associate ad importante calo ponderale. Il dosaggio sierico della transtiretina (prealbumina) è un indicatore dello stato nutrizionale che permette una stratificazione del rischio di morbilità e mortalità [19]. Oltre ad essere utilizzato come indicatore di malnutrizione e cachessia [10,17], il dosaggio sierico della prealbumina pre-operatoria è stato recentemente utilizzato come fattore predittivo di recidiva nei pazienti operati per tumore al colon retto, anche se il rapporto tra il valore della prealbumina e la sopravvivenza al cancro non è ancora stato completamente chiarito [34]. Le citochine infiammatorie, ed in particolar modo il TNF, determinano neurotossicità e neuro degenerazione [37]. E' stato dimostrato in modelli sperimentali animali che nella cachessia si verifica un' alterata espressione dei canali del potassio nel cervello con alterazione della

funzionalità dello stesso [14]. Alcune osservazioni indicano che l'anoressia sia proprio dovuta all'alterata espressione dei canali del potassio. Sembra quindi che i canali ionici del tessuto nervoso siano un bersaglio delle citochine infiammatorie e che la loro alterazione sia legata ad alterazioni cognitive, comportamentali e all'anoressia. Oltre ai fattori umorali, altre molecole di derivazione specifica tumorale sono state proposte come mediatori nella cachessia. In studi sperimentali di tumori del colon murino (MAC16) si è per esempio evidenziato il fattore metabolizzante i lipidi (LMF); in molti tumori viene secreto il fattore inducente anemia (AIS), che deprime la funzionalità dei globuli rossi e delle cellule immunitarie. Un proteoglicano (fattore inducente proteolisi - PIF) sembra determinare proteolisi sia in vitro sia in vivo nelle cellule muscolari, come anche attivare la risposta di fase acuta.

1.3. Altre alterazioni del muscolo scheletrico

Una delle principali caratteristiche della cachessia è l'astenia e la diminuzione della forza muscolare, direttamente collegate alla perdita di massa muscolare. Nei lunghi digiuni, il fisiologico aumento della degradazione proteica tipica del digiuno viene rallentato, per conservare azoto e quindi mantenere la massa magra. Nel cancro questo meccanismo di compenso sembra non essere attivato, determinando un consumo di proteine vitali. Il muscolo scheletrico è severamente colpito nella cachessia neoplastica e si è evidenziato come il consumo delle proteine muscolari sia dovuto ad un aumento del loro turnover. Dato che la cachessia si sviluppa negli stadi molto avanzati di malattia, la prevenzione di questo consumo proteico muscolare è di notevole interesse clinico. E' ancora dibattuto se il bilancio proteico negativo dipenda da una alterata sintesi o da un' aumentata degradazione, o da entrambi [4]. Parte del catabolismo muscolare proteico sembra essere dovuto inoltre all'aumentata produzione delle proteine di fase acuta da parte del fegato. L'aumentato catabolismo proteico determina un aumento degli aminoacidi circolanti (specialmente Alanina e Glutamina), che a loro volta sono utilizzati dal fegato proprio per la sintesi delle proteine di fase acuta. Pochi studi descrivono il coinvolgimento di diversi fattori trascrizionali nella perdita di massa muscolare. Sembra che il TNF diminuisca il contenuto di MyoD nelle colture di mioblasti e blocchi la differenziazione attraverso un fattore trascrizionale correlato alla p53. Le citochine sembrano quindi agire soprattutto sulle cellule satelliti, bloccando la loro differenziazione, e quindi la rigenerazione delle fibre muscolari [4,15].

1.4. Metabolismo nel cancro del colon retto

Il cancro del colon retto non è tipicamente dominato da un'alterata capacità di assunzione di cibo [31]. L'ipermetabolismo associato alle neoplasie rimane

ancora poco compreso e studiato, ma sembra che il tipo di neoplasia sia comunque correlato alle alterazioni del metabolismo, infatti i pazienti affetti da neoplasie ematologiche, cancro del polmone e gastrico sono tipicamente ipermetabolici, mentre quelli affetti da neoplasia epatobiliare o ginecologica sono ipometabolici [29]. Uno studio specifico sul cancro colo-rettale ha dimostrato come le alterazioni metaboliche non siano correlate ad un alterato apporto calorico proteico quanto determinate da fattori tumorali. Si è evidenziato, infatti, come lo stadio avanzato (III e IV) e caratteristiche istologiche di aggressività siano correlate ad un consumo energetico maggiore, con conseguente ipermetabolismo. Nei pazienti affetti da neoplasia colo-rettale, in altre parole, i normali adattamenti metabolici al digiuno e alla perdita di peso non avvengono, con conseguente persistente ipermetabolismo [29]. Tra le alterazioni metaboliche che avvengono nelle malattie croniche, sepsi, malnutrizione e, verosimilmente, anche nella cachessia, vi è l'alterazione dell'asse GH e IGF-I con una resistenza acquisita al GH, che si manifesta con alti livelli di GH e corrispettivi bassi livelli delle IGF-I. Il tipo di neoplasia sembra coinvolgere in modo diverso questo sistema neuroendocrino, infatti nei pazienti con neoplasia gastrica, caratterizzata da un alterato introito alimentare e quindi malnutrizione, tale asse non è alterato ed è quindi lo stato nutrizionale che controlla l'asse GH-IGF-I. Nei pazienti con cancro coloretale invece (ove non è quasi mai presente malnutrizione) vi è una resistenza al GH, non adattativa, ma generata quindi dal tumore stesso. C'è perciò un passaggio ad uno stato catabolico che viene corretto dalla rimozione della neoplasia [22].

1.5. Il muscolo scheletrico

Il muscolo scheletrico è composto da fascicoli costituiti da elementi cellulari specializzati allungati, con numerosi nuclei disposti alla periferia, detti fibre muscolari o miofibre. Le miofibre sono molto grandi rispetto agli altri elementi cellulari dell'organismo ed hanno un diametro medio di 60 micron nel giovane adulto. Nell'anziano esse subiscono una progressiva atrofia, legata alla sedentarietà ed al naturale invecchiamento dei tessuti. Ciascuna fibra muscolare è rivestita da una membrana cellulare detta sarcolemma e presenta in posizione periferica subsarcolemmale numerosi nuclei costituiti da cromatina densa. All'interno del sarcolemma è contenuto il citoplasma cellulare detto sarcoplasma, nel quale sono presenti le strutture contrattili del muscolo rappresentate dalle miofibrille con le caratteristiche striature trasversali, e da altri organuli non visibili in microscopia ottica, quali i mitocondri. Nel muscolo sono inoltre osservabili in microscopia elettronica, o marcandole con anticorpi specifici, piccole cellule mononucleate specializzate disposte in aree subsarcolemmale, dette cellule satelliti. Esse si attivano e diventano più

numerose nei processi di ipertrofia e di rigenerazione muscolare, mentre diminuiscono in caso di inattività.

1.5.1. Microscopia elettronica

Il dettaglio morfologico delle strutture funzionali della fibra muscolare, che non sono ben visibili in microscopia ottica, è evidenziato all'esame in microscopia elettronica. La sezione longitudinale delle miofibre evidenzia una caratteristica struttura striata delle miofibrille, dovuta alla regolare alternanza dei filamenti delle proteine contrattili: l'actina e la miosina. L'unità funzionale della miofibra è il sarcomero. Esso si estende tra due linee Z consecutive, formate da materiale elettrone-denso agganciato ai filamenti di actina. I miofilamenti sono costituiti dalle proteine contrattili actina e miosina, che rappresentano il motore della contrazione muscolare. Questa è realizzata dallo scorrimento dei filamenti di actina lungo quelli di miosina, che si avvicinano alla banda A, composta da spessi filamenti di miosina, riducendo la lunghezza del sarcomero con conseguente accorciamento dell'unità di contrazione. Il sistema che permette il trasporto del segnale elettrico nervoso dalla membrana cellulare alle unità di contrazione (sarcomeri) è costituito dal reticolo sarcoplasmatico e dal sistema dei Tubuli Traversi, detti tubuli T, che derivano da invaginazioni e dilatazioni del sarcolemma stesso. In queste strutture il segnale elettrico che si diffonde lungo il sarcolemma viene trasformato in segnale chimico attraverso la mediazione di ioni calcio che vengono rilasciati dal Reticolo Sarcoplasmatico in prossimità dei filamenti contrattili. Altre strutture submicroscopiche fondamentali sono i mitocondri, organelli membranosi dotati di un sistema di creste e ricchi di enzimi del ciclo di Krebs, deputati alla respirazione cellulare e allo sviluppo di energia. Il microscopio elettronico evidenzia inoltre le sostanze che forniscono energia alle fibre, il glicogeno ed i lipidi, rispettivamente sotto forma di granuli e di materiale accumulato in vacuoli sarcoplasmatici. Sono questi i combustibili cellulari bruciati dall'ossigeno, che diffonde dai capillari sanguigni.

1.5.2. Istochimica

Le reazioni istochimiche enzimatiche ed in particolare la reazione alcalina per la evidenziazione dell'attività adenosintrifosfatase (ATPasi, pH 9.6) permettono una differenziazione più netta tra i due principali tipi di fibre: le fibre di tipo I (miofibre a contrazione lenta e resistenti alla fatica), che si colorano in modo tenue, e le fibre di tipo II (miofibre a contrazione rapida e poco o pochissimo resistenti alla fatica), che si colorano intensamente di marrone-nero. Utilizzando la reazione acida per l'attività adenosintrifosfatase (ATPasi, pH 4.7) si differenziano tre tipi di fibre: le fibre di tipo I, di tipo IIA e di tipo IIB. Quest'ultimo sistema di caratterizzazione tipologica delle fibre viene utilizzato negli studi sulla plasticità muscolare e per evidenziare

aspetti di transizione nei fenomeni di trasformazione dei tipi di fibra. I tipi di fibre dipendono in modo stretto dal sistema nervoso e più precisamente dall'attività delle cellule delle corna anteriori, che ne determinano le caratteristiche istologiche, biochimiche e fisiologiche, ed in particolare il tipo di contrattilità e di resistenza alla fatica. L'innervazione del muscolo condiziona e mantiene poi per tutta la vita i tipi, e cioè le caratteristiche fisiologiche e biochimiche, delle fibre muscolari. I tipi di fibre che compongono i muscoli scheletrici nell'uomo sono mescolati in modo abbastanza uniforme, formando un mosaico di fibre chiare di tipo I e scure di tipo II dopo colorazione con ATPasi a pH alcalino. Tuttavia i due tipi di fibre si presentano in proporzione diversa da muscolo a muscolo in relazione al tipo ed intensità della contrazione del muscolo stesso, ma sempre con differenze variabili da persona a persona, introducendo l'ipotesi di una variabilità genetica nell'ambito della specie. Ad esempio il muscolo soleo è composto all'80% da fibre di tipo I, mentre il muscolo quadricipite femorale presenta una predominanza netta delle fibre di tipo II.

1.5.3. Fibre di tipo I

Le fibre di tipo I sono anche dette fibre rosse in quanto sono irrorate da un elevato numero di capillari sanguigni e fibre lente per una cinetica di contrazione-rilasciamento più prolungata delle fibre di tipo II, dette anche bianche e rapide. Le fibre di tipo I costituiscono specie nei mammiferi di media o grossa taglia i muscoli che macroscopicamente si presentano rossi, anche per essere molto ricchi del pigmento detto mioglobina. Queste fibre posseggono numerosi mitocondri ed un quantitativo elevato di glicogeno, da cui i mitocondri attingono l'energia per la contrazione per via prevalentemente aerobica. In queste fibre gli enzimi mitocondriali del ciclo di Krebs e le proteine della catena respiratoria (di trasporto degli elettroni) sono presenti in quantità maggiore rispetto alle fibre di tipo II. Le fibre di tipo I sono inoltre caratterizzate da una elevata resistenza allo sforzo.

1.5.4. Fibre di tipo II

Le fibre di tipo II sono caratterizzate da una cinetica di contrazione rapida, assai più breve e potente rispetto alle fibre di tipo I, anche per essere in quasi tutte le specie di dimensioni maggiori rispetto alle fibre muscolari lente/ossidative. Esse hanno una resistenza molto limitata allo sforzo. Queste fibre producono infatti energia per via anaerobica per l'azione di enzimi quali la glicogeno fosforilasi, che liberano energia dal glicogeno che si riaccumula nelle miofibre durante le pause di rilasciamento. Reagiscono all'allenamento intenso, quasi massimale, diventando ipertrofiche per accumulo di proteine contrattili. Questo tipo di fibre si è dimostrato particolarmente suscettibile all'inattività ed andando incontro ad atrofia nell'invecchiamento,

anche per concomitanti eventi di denervazione periferica [32].

1.5.5. Plasticità del muscolo scheletrico

Una caratteristica essenziale del tessuto muscolare scheletrico è la plasticità. Esso può, infatti, alterare le sue caratteristiche funzionali, morfologiche e metaboliche, e andare incontro a trasformazione da un tipo di fibra al tipo opposto [5,32]. Questo si realizza in alcune situazioni patologiche ed in seguito a stimoli esterni quali l'allenamento intenso o la stimolazione elettrica funzionale prolungata ed intensa. I muscoli sottoposti ad allenamento a sforzi progressivi e prolungati nel tempo si modificano nella loro tipologia attraverso una trasformazione delle fibre di tipo II affaticabili erapidi, in fibre di tipo I a contrazione lenta e con maggiore resistenza allo sforzo. Al contrario un allenamento prolungato nel tempo, a sforzi rapidi ma di breve durata, trasforma le fibre di tipo I resistenti e lente, in fibre di tipo II a contrazione veloce ma rapidamente esauribili, o meglio ipertrofizza selettivamente questi tipi di fibre. Ne consegue una ipertrofia muscolare selettiva con evidente predominanza tipologica di un tipo di fibra nei muscoli allenati con protocolli diversi di esercizio [32]. La presenza di nuclei multipli in un comune citoplasma, pone il problema del loro controllo coordinato nelle fibre muscolari. Fino a qualche tempo fa, poco era conosciuto sui meccanismi che regolano l'atrofia/ipertrofia muscolare. Recenti studi hanno evidenziato come l'atrofia sia correlata anche ad una diminuzione dei mionuclei, mentre nell'ipertrofia si verifici il fenomeno dell'arricchimento del patrimonio nucleare, prospettando l'ipotesi che ogni mionucleo controlli un determinato volume delle miofibre (dominio mionucleare). Altri lavori recenti hanno dimostrato come la somministrazione di IGF-I riduca significativamente la diminuzione sia del numero dei mionuclei che delle miofibre, facendo ipotizzare una dipendenza del numero dei mionuclei dagli effetti degli ormoni circolanti GH/IGF-I. E' stato dimostrato che i mionuclei ed i domini mionucleari sono capaci di rispondere individualmente a segnali locali. Mionuclei in particolari regioni subcellulari, per esempio la placca neuromuscolare, sono capaci di esprimere alcuni geni inattivi nel resto dei mionuclei, così come avviene anche nelle giunzioni mio-tendinee [2]. La plasticità volumetrica, ma anche quella qualitativa sono sotto il controllo di meccanismi trascrizionali che, massimamente attivi durante la miogenesi ontogenetica e rigenerativa, sono responsabili delle trasformazioni isogeniche che determinano le diverse espressioni quantitative e qualitative della plasticità muscolare. Plasticità e tipizzazione delle miofibre muscolari possono quindi essere più analiticamente studiate a livello dei meccanismi traslazionali e post-traslazionali, oltre che misurando le cinetiche di

Serum and tissue markers in colorectal cancer at onset

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (3): 125-146

accumulo e di eliminazione dei relativi prodotti proteici (sintesi e degradazione proteica).

1.5.6. Rigenerazione muscolare

Il tessuto muscolare scheletrico è un tessuto stabile, con modesto turnover dei nuclei, la sostituzione settimanale è di circa l'1-2% dei nuclei. Riesce però a rigenerare rapidamente e molto estesamente in risposta a danni severi. La rigenerazione è caratterizzata da due fasi: una fase demolitiva ed una rigenerativa. La degenerazione è caratterizzata dalla distruzione della membrana plasmatica e delle miofibrille e dall'incremento sierico delle proteine muscolari come la creatinichinasi (CK), la latticodeidrogenasi (LDH), e l'aldolasi (ALD). Il loro aumento permette di distinguere precocemente alcune forme di distrofia muscolare, ma in realtà qualsiasi condizione che comporti alterazioni del tessuto muscolare striato, primitiva o secondaria, può associarsi ad aumenti significativi dell'attività plasmatica di questi enzimi. Per questo motivo, in caso di lesioni traumatiche, di processi distruttivi localizzati (ascessi) o diffusi (cachessia), e di alterazioni metaboliche (compreso l'esercizio fisico intenso), si può avere un aumento degli enzimi muscolari circolanti ed in linea generale l'entità dell'aumento dei livelli sierici è correlato sia alla massa muscolare totale, sia a quella effettivamente lesa. Ovviamente, per interpretare l'aumento dell'attività sierica di questi enzimi come indice specifico di alterazioni della muscolatura scheletrica, è necessario che siano dosati enzimi tessuto-specifici, e

cioè le isoforme proprie del tessuto muscolare scheletrico. Nella patologia della muscolatura scheletrica si ha coinvolgimento delle frazioni isoenzimatiche 4 e 5 delle LDH, mentre aldolasi e CK possono essere rilasciate anche in caso di patologie del miocardio e del fegato. L'anidrasi carbonica III (CAIII), che è localizzata esclusivamente nelle miofibre scheletriche, è un ottimo marcatore di malattie neuromuscolari: essa aumenta nel siero anche dei soggetti sani in seguito a traumi muscolari o ad esercizio muscolare intenso [16]. Nelle prime fasi dei processi demolitivi/rigenerativi vi è una attivazione delle cellule mononucleate, principalmente infiammatorie. I neutrofili sono presenti già nelle prime 1-6 ore dal danno; successivamente, dopo circa 48 ore, prevalgono i macrofagi, che oltre a fagocitare i residui cellulari, sembrano concertare le prime fasi di rigenerazione. Si ha quindi una fase di proliferazione cellulare di cellule miogeniche (cellule satelliti residenti e forse ematiche) che si differenziano e si uniscono tra loro o con le fibre danneggiate per formare nuove fibre o riparare quelle lese. La caratteristica istologica di questo evento è la presenza di piccole miofibre centro nucleate. Queste fibre sono spesso basofile ed esprimono isoforme embrionali di Miosina (MHCemb). Nuclei centrali o internalizzati sono individuati in zone particolari delle fibre o in tutta la nuova fibra, indicando che è un fenomeno localizzato in prossimità della sede del danno. Avvenuta la fusione e la prima crescita della miofibra, i mionuclei si spostano in periferia. In queste fasi vi è

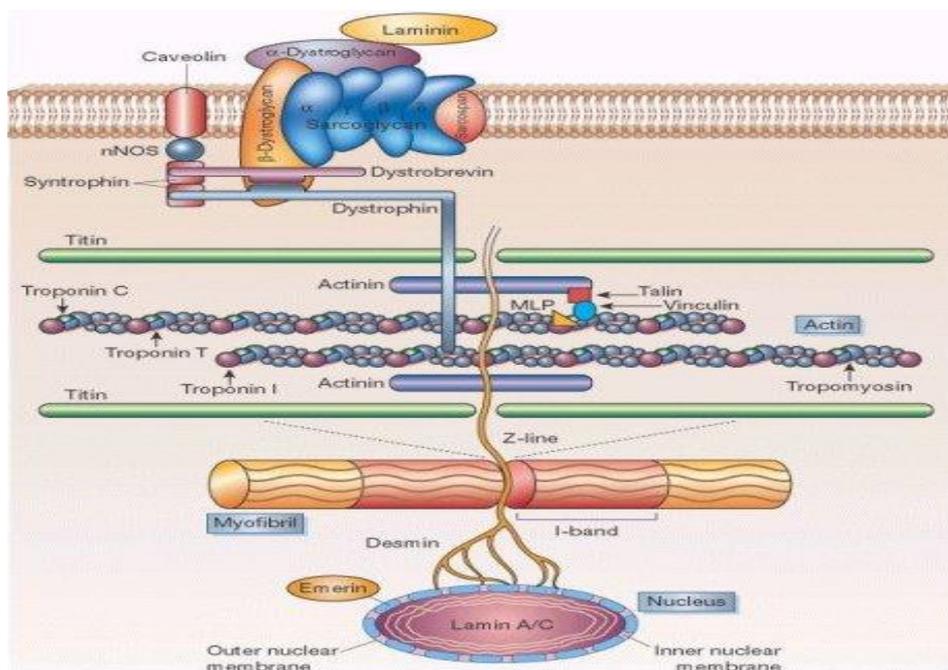


Fig 1. Il complesso Distrofina-Glicoproteine. Mantiene l'integrità della membrana cellulare e crea uno stretto legame tra citoscheletro e matrice extracellulare.

Tabella 1. Caratteristiche demografiche dei pazienti neoplastici e dei pazienti non neoplastici.

	Pazienti neoplastici 50	Pazienti non neoplastici 25	p-value
Età Mediana (IQR)	67 (61-70)	61 (35-66)	N.S
Sesso M:F	28:22	18:7	N.S

F:femmina; M:maschio;IQR: intervallo interquartile; N.S.:non significativo

un'alterazione dell'espressione genica e si ha la comparsa di alcune proteine intracellulari come le MHCemb. Le cellule satelliti attivate hanno però la necessità di interagire con i numerosi fattori e stimoli presenti nel mezzo extracellulare. A livello delle proteine transmembrana si ha per esempio l'espressione di molecole di adesione trasducenti segnali come la molecola di adesione delle cellule neurali (NCAM). Questa molecola di adesione cellulare è coinvolta nella differenziazione neurale, ma è espressa anche in miofibre denervate. Nella rigenerazione muscolare, la sua espressione è coincidente con i più precoci marcatori di differenziazione cellulare [11,26]. Oltre alla forma tessutale, esiste anche una isoforma solubile dell'NCAM (sNCAM) il cui dosaggio sembra essere correlato alla diffusione metastatica del tumore [12].

1.5.7. Il complesso Distrofina-Glicoproteine

La Distrofina appartiene alla superfamiglia delle spectrine ed è una lunga proteina citoscheletrica legata all'actina. Essa contiene quattro domini strutturali: un dominio N-terminale che lega l'actina, un lungo dominio centrale, un dominio ricco di cisteina ed un dominio C-terminale. La distrofina è localizzata lungo la faccia interna del sarcolemma e lega l'F-actina al citoscheletro sia attraverso il dominio N-terminale che quello lungo centrale. Il dominio ricco di cisteina è importante invece per l'associazione funzionale del Dystrophin-associated proteins (DAPS) con gli elementi extracellulari. Il DAPS consiste di un numero di proteine che si legano molto saldamente alla distrofina, con cui forma il Complesso Distrofina-Glicoproteine (DGC), e crea un collegamento meccanico tra il citoscheletro e la matrice extracellulare; questo complesso di proteine nel sarcolemma delle cellule muscolari scheletriche e cardiache è critico per l'integrità della membrana cellulare. Il complesso DAPS-distrofina agisce come un'unità, perché difetti di molti di questi componenti a livello genico causano diverse distrofie muscolari (Figura 1). Oltre ad avere una localizzazione sub sarcolemmale la distrofina è associata anche ai tubuli T. La distrofina è anche concentrata a livello delle giunzioni neuromuscolari e delle giunzioni

miotendinee assieme ad una proteina omologa l'eutrofina. La funzione principale della distrofina e delle proteine associate è, a livello strutturale, quella di realizzare un collegamento stabile tra l'actina intracellulare del citoscheletro e la matrice extracellulare. Di conseguenza, la perdita della distrofina indebolisce la stabilità meccanica del sarcolemma predisponendo la membrana a danni locali che porterebbero all'entrata di ioni calcio. L'aumentata concentrazione del livello del calcio intracellulare attiva l'attività di enzimi catabolici portando alla morte delle fibre muscolari, ad esempio nella distrofia muscolare di Duchenne (DMD) o nell'esercizio muscolare eccentrico [6].

1.5.8. Miopatie e miositi paraneoplastiche

In pazienti con sepsi o in stato critico spesso si evidenzia una sindrome caratterizzata da debolezza muscolare, in cui coesistono sia fenomeni neuropatici sia miopatici primari. In studi su biopsie muscolari di questi pazienti si è inoltre evidenziata la presenza di alterazioni miopatiche, in assenza di alterazioni elettrofisiologiche. Oltre alle note patologie muscolari da denervazione o da traumi esistono una vasta scala di miopatie di varia origine [3,13]. Ben nota è l'associazione per esempio tra cancro e miopatie autoimmuni, come la polimiosite e la dermatomiosite. L'esatta relazione tra i due eventi non è ben chiara; si è dimostrato che soprattutto nella dermatomiosite vi è un aumentato rischio di cancro, in particolare ovarico, polmonare, gastrico e coloretale [20]. Esistono poi evidenze sulla presenza anche di miositi paraneoplastiche, che presentano un tipico decorso strettamente correlato al trattamento della neoplasia di base [20,28]. Singole pubblicazioni hanno riportato il riscontro per esempio di altre forme di miopatia su base reumatologica (polimialgia reumatica) in pazienti affetti da cancro del colon retto [23]. Altro interessante gruppo di miopatie è rappresentato dal gruppo delle miopatie centronucleate, caratterizzate dalla presenza di piccole fibre con nuclei localizzati centralmente alla fibra. L'internalizzazione del nucleo in fibre mature può essere riscontrato anche in una vasta gamma di disordini muscolari, incluse miopatie primarie (distrofia miotonica), ma è tipica della Miopatia

Serum and tissue markers in colorectal cancer at onset

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (3): 125-146

Tabella 2. Sede e stadiazione post operatoria delle neoplasie.

Sede neoplasia	numero (%)
Colon destro	8 (16)
Colon sinistro	28 (56)
Retto	13 (26)
Colon-retto	1 (2)

Stadio neoplasia	numero (%)
pTis/T1/T2	23 (46)
pT3/T4	27 (54)
pN0	36 (72)
pN1-2	14 (28)
pM0	47 (94)
pM1	3 (6)

Centronucleata, che si presenta in 3 forme, una X-linked, una Autosomica Dominante e una Recessiva, con caratteristiche genetiche ed istologiche differenti [27,30]. Occasionalmente i mionuclei possono essere riscontrati in posizione centrale o centralizzata anche nelle biopsie considerate non oncologiche; si considera quindi normale fino ad un 5% di fibre con nuclei centrali e centralizzati [27]. Numerose diverse condizioni sono note per alterare la posizione del mionucleo; la posizione centrale e centralizzata del nucleo risulta quindi un elemento aspecifico. Le fibre rigeneranti e ipertrofiche hanno frequentemente una significativa percentuale di nuclei centrali/centralizzati, così come gli stadi precoci di distrofia; anche neuropatie croniche presentano un aumentato numero di fibre con nuclei centralizzati. Il meccanismo che regola la migrazione del nucleo (per esempio nello sviluppo embrionale e fetale) è tuttora sconosciuto. La varietà delle condizioni in cui si evidenziano fibre con nuclei internalizzati ha portato a ipotizzare diverse cause, come l'arresto dello sviluppo muscolare, cause neurogene, alterazione della maturazione delle fibre. Studi genetici sulle Miopatie Centronucleate stanno individuando geni coinvolti, come per esempio quello codificante per la miotubularina [27]. A livello biumorale l'aumento degli indici di flogosi (VES, PCR, alfa-2-globuline, etc.) e degli enzimi muscolari (CK, LDH, Aldolasi) è un dato aspecifico che si riscontra in molte patologie, comprese le miopatie primarie e secondarie.

2. Obiettivi dello studio

Lo scopo primario del presente studio è di identificare in pazienti con neoplasia del colon retto alterazioni/reazioni miopatiche precoci correlate al

cancro (delocalizzazione dei nuclei, segni di degenerazione e rigenerazione muscolare), con l'intento di individuare nuovi biomarcatori diagnostici precoci di neoplasia. Questo studio si propone inoltre di ricercare marcatori sierologici che accompagnino la presenza nelle biopsie muscolari di pazienti con neoplasia del colon retto all'esordio di alterazioni miopatiche precoci (e quindi in assenza di sintomi clinici di miopatia o cachessia) da utilizzare come biomarcatori umorali diagnostici e/o prognostici.

3. Materiali e Metodi

3.1. Pazienti

Presso l'Unità di Chirurgia Coloproctologica della Clinica Chirurgica I dell'Università degli Studi di Padova, dal mese di Luglio 2008 al mese di Novembre 2012, tutti i pazienti candidati a resezione colica laparoscopica o laparotomica per neoplasia del colon retto sono stati arruolati nello studio (Tabella 1). Criteri d'esclusione sono stati considerati: chemio-radioterapia neoadiuvante; perdita di peso >10% negli ultimi sei mesi; segni o sintomi clinici di miopatia; presenza di astenia o debolezza muscolare. Un gruppo di pazienti candidati a intervento chirurgico per patologia benigna non oncologica e non infiammatoria è stato incluso nello studio come gruppo di controllo. Tutti i pazienti sono stati arruolati previo consenso informato scritto [40]. Prima dell'intervento sono stati registrati l'Indice di Massa Corporea (Body Mass Index; BMI), le caratteristiche demografiche, l'anamnesi medica, chirurgica e farmacologica e sono stati dosati i marcatori di neoplasia comunemente impiegati nella pratica clinica (CEA, Ca19.9, α FP). I pazienti sono stati sottoposti a intervento chirurgico in anestesia generale o spinale con tecnica laparoscopica

Serum and tissue markers in colorectal cancer at onset

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (3): 125-146

Tabella 3. Caratteristiche istopatologiche riscontrate nelle biopsie muscolari dei pazienti neoplastici e dei pazienti non neoplastici.

	Pazienti neoplastici 50	Pazienti non neoplastici 25	p-value
Fibre con nuclei internalizzati (%)	13.1 (6.0-20.3)	3.0 (2.5-6.1)	<0.0001
Diametro fibre (μm)	53.7 (47.2-59.2)	50.3 (44.7-55.9)	0.23
Fibre tipo II (%)	54.0 (44.3-63.0)	46.0 (39.0-62.5)	0.16
Biopsie MHCemb positive (%)	6 (12%)	2 (11%)	0.99
Biopsie NCAM positive (%)	20 (40%)	3 (16%)	0.09

Dati espressi come Mediana (IQR); IQR: intervallo interquartile; MHCemb: isoforma embrionale della catena pesante della miosina; NCAM: molecola di adesione cellulare neuronale; N.S.: non significativo

o laparotomica; al momento dell'induzione dell'anestesia è stato eseguito il prelievo venoso per la determinazione sierica dei marcatori di infiammazione (PCR) e di miopatia (CK).

3.2. Biopsie muscolari

Tutti i pazienti, all'inizio dell'intervento chirurgico, sono stati sottoposti a biopsia a cielo aperto del muscolo rectus abdominis; le biopsie sono quindi state immediatamente congelate e conservate in azoto liquido fino all'uso.

3.3. Analisi morfologiche su sezioni criostatiche

Sezioni trasverse delle biopsie sono state allestite utilizzando un criostato alla temperatura di -24°C . Le sezioni destinate all'analisi istologica e immunohistochemica (spessore di $8\ \mu\text{m}$) sono state

disposte su vetrini portaoggetti precedentemente trattati con polilisina. I vetrini sono stati conservati a -20° fino al momento dell'uso. L'utilizzazione di sezioni seriali ha permesso di eseguire le analisi in un ristretto intervallo, non superiore a $150\ \mu\text{m}$, che si può assumere come istologicamente omogeneo, almeno in tessuti muscolari normali.

3.3.1 Analisi istologiche

Alcune sezioni sono state colorate con Ematossilina ed Eosina (E&E). L'Ematossilina è un colorante basico che colora di blu la cromatina del nucleo, mentre l'Eosina è un colorante acido che colora in varie gradazioni di rosso-rosa il citoplasma e il tessuto interstiziale. Sezioni di $8\ \mu\text{m}$ sono state immerse per 15 minuti in Ematossilina di Mayer, lavate per un minuto in acqua distillata per eliminare l'eccesso di colorante,

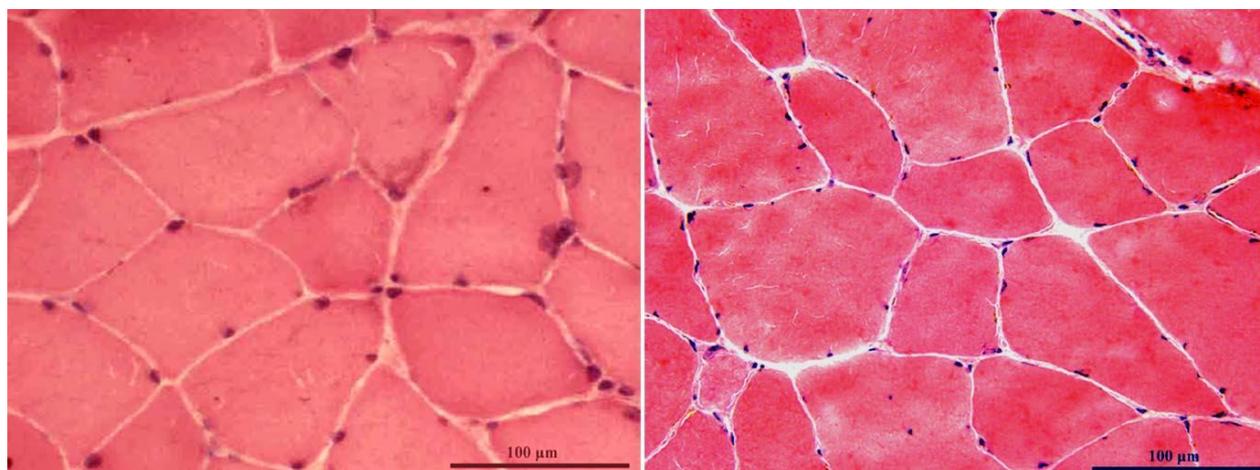


Fig 2. Aspetti istologici di muscolo normale e di retto dell'addome di pazienti non neoplastici. Ematossilina ed Eosina. Barra di calibrazione $100\ \mu\text{m}$. A, muscolo normale; B, muscolo di pazienti non neoplastici.

Serum and tissue markers in colorectal cancer at onset

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (3): 125-146

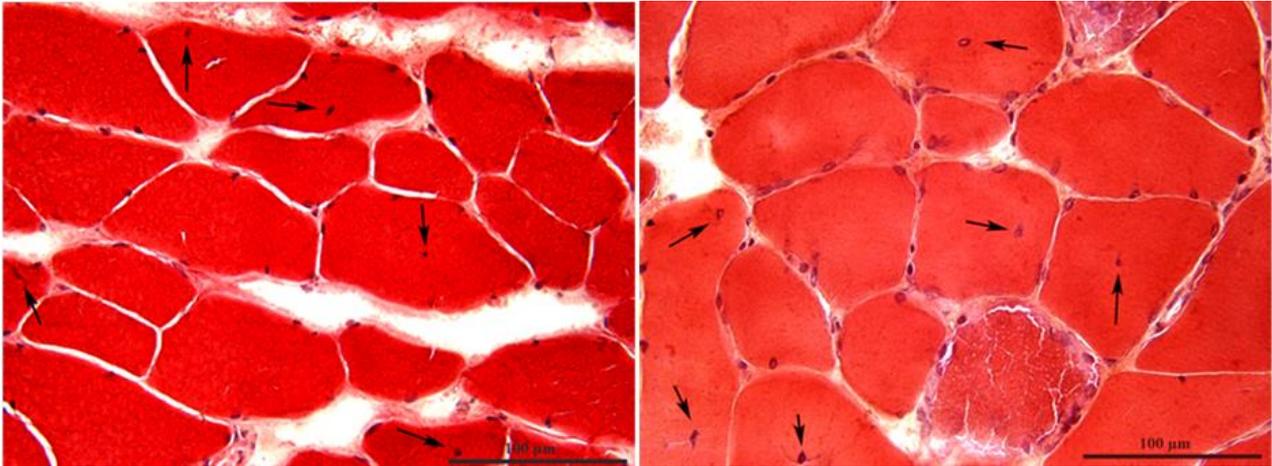


Fig 3. Aspetti istologici di retto dell'addome di pazienti affetti da neoplasia del colon retto. Ematossilina ed Eosina. Barra di calibrazione 100 µm. A, muscolo di pazienti neoplastici che non assumono farmaci miotossici; B, muscolo di pazienti neoplastici che assumono farmaci miotossici. Nei pazienti il muscolo presenta numerose fibre con una distribuzione anomala dei mionuclei (in numero maggiore nei pazienti che assumono farmaci miotossici, B).

fatte virare per 20 minuti in acqua corrente e colorate con Eosina 0.5% per un minuto. Dopo un breve lavaggio in acqua distillata, i preparati, disidratati in soluzioni di etanolo a concentrazioni crescenti (70%, 95%, 100%) e un passaggio in xilolo, sono stati montati con Balsamo del Canada, osservati al microscopio ottico ed utilizzati per le analisi morfometriche come successivamente descritte.

3.3.2 Analisi istochimiche

L'attività ATPasica miofibrillare è evidenziata istochimicamente dopo preincubazione a pH basico o acido. Sezioni seriali da 8 µm sono state preincubate a temperatura ambiente per tre minuti in una soluzione di paraformaldeide al 5% in presenza di Na cacodilato 200 mM, CaCl₂ 68 mM, saccarosio 340 mM. Dopo lavaggio con una soluzione di Tris-HCl 0.1 M, CaCl₂

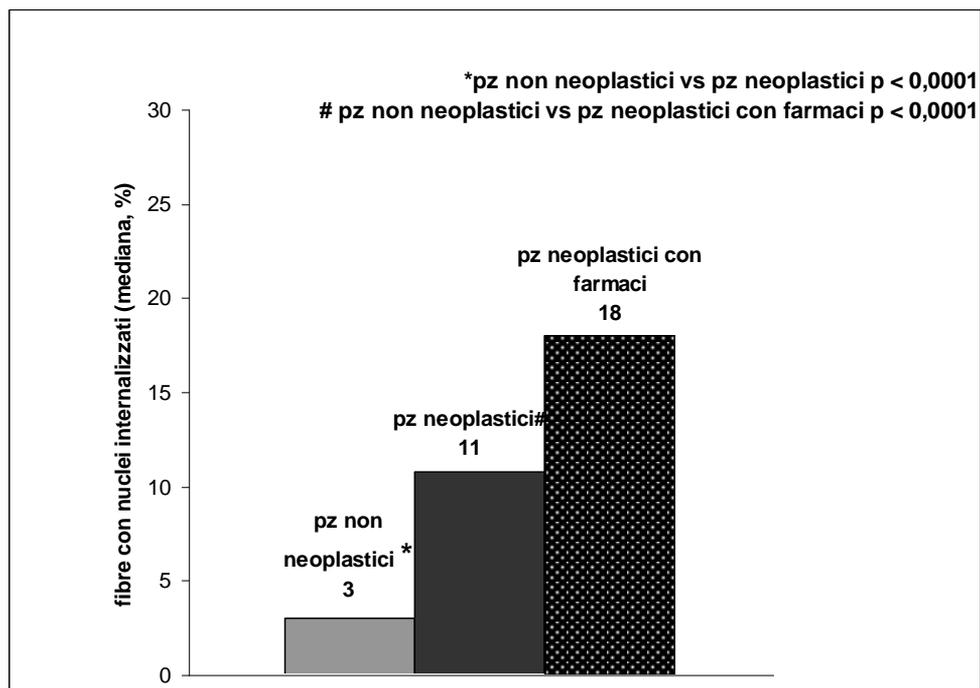


Fig 4. Mediane dei valori percentuali delle fibre con nuclei internalizzati nei pazienti non neoplastici (3%), nei pazienti neoplastici (11%) e nei pazienti neoplastici che assumono farmaci miotossici (18%).

Serum and tissue markers in colorectal cancer at onset

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (3): 125-146

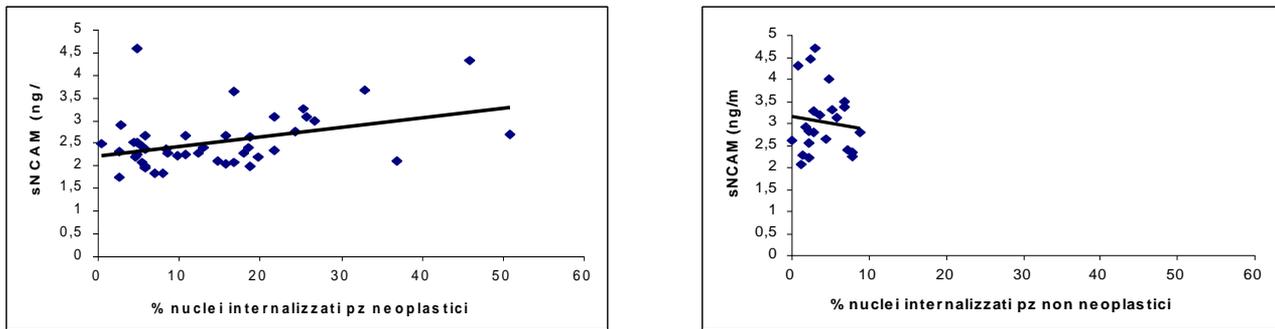


Fig 5. Correlazione tra % di nuclei internalizzati e concentrazione di sNCAM sierico (ng/ml). A sinistra, correlazione nei pazienti neoplastici; A destra, correlazione nei pazienti non neoplastici.

18 mM a pH 7.8, le sezioni sono state preincubate per 15 minuti a temperatura ambiente in una soluzione di 2-amino-2-metilpropanolo 0.2 M pH 10.4. Dopo un ulteriore lavaggio con la soluzione di Tris-HCl 0.1 M, CaCl₂ 18 mM a pH 7.8, le sezioni muscolari sono state incubate per 45 minuti a 37°C in una soluzione di 0.04 M di Na barbiturato, 18 mM di CaCl₂ e 2.76 mM ATP pH 9.4 (mezzo per ATP). Contemporaneamente, sezioni seriali successive dei medesimi campioni sono state preincubate in una soluzione di K acetato a pH 4.35 per 10 minuti e, dopo lavaggio in Tris-HCl 0.1 M, CaCl₂ 18 mM a pH 7.8, incubate nel mezzo con ATP per 35 minuti a 37°C. La messa in evidenza del fosfato di calcio, prodotto dalla reazione di scissione dell'ATP, si ha incubando i vetrini per 3 minuti in una soluzione al 2% di CoCl₂, si forma così fosfato di cobalto. Segue la reazione con (NH₄)₂S e la formazione di solfuro di cobalto che dà un precipitato nero. Le fibre di tipo 1 (a contrazione lenta) sono alcali-labili perciò, dopo preincubazione a pH basico, risultano chiare mentre le fibre di tipo 2 (a contrazione rapida), che sono alcali-resistenti, risultano scure. A pH 4.35 le fibre di tipo 1

acido-resistenti sono scure mentre le fibre di tipo 2 sono chiare. Le sezioni sono state quindi immerse per 15 minuti in Ematossilina di Mayer, per la controcolorazione dei nuclei, lavate per un minuto in acqua distillata per eliminare l'eccesso di colorante, fatte virare per 20 minuti in acqua corrente. Successivamente i preparati sono stati disidratati in soluzioni di etanolo a concentrazioni crescenti (70%, 95%, 100%) ed un passaggio in xilolo ed infine montati con Balsamo del Canada per l'osservazione al microscopio ottico.

3.3.3 Analisi immunocistochimiche

Le sezioni criostatiche (spessore 8 µm) dopo lavaggio con gli opportuni tamponi (preceduto solo nel caso dell'NCAM da preincubazione in metanolo freddo, a -20°C per 10 minuti) sono state incubate in siero di capra al 10 % a temperatura ambiente per 20 minuti e nel rispettivo anticorpo, per dimostrare la presenza di fibre rigeneranti esprimenti la isoforma embrionale della miosina e la molecola di adesione cellulare neuronale NCAM, la presenza di cellule

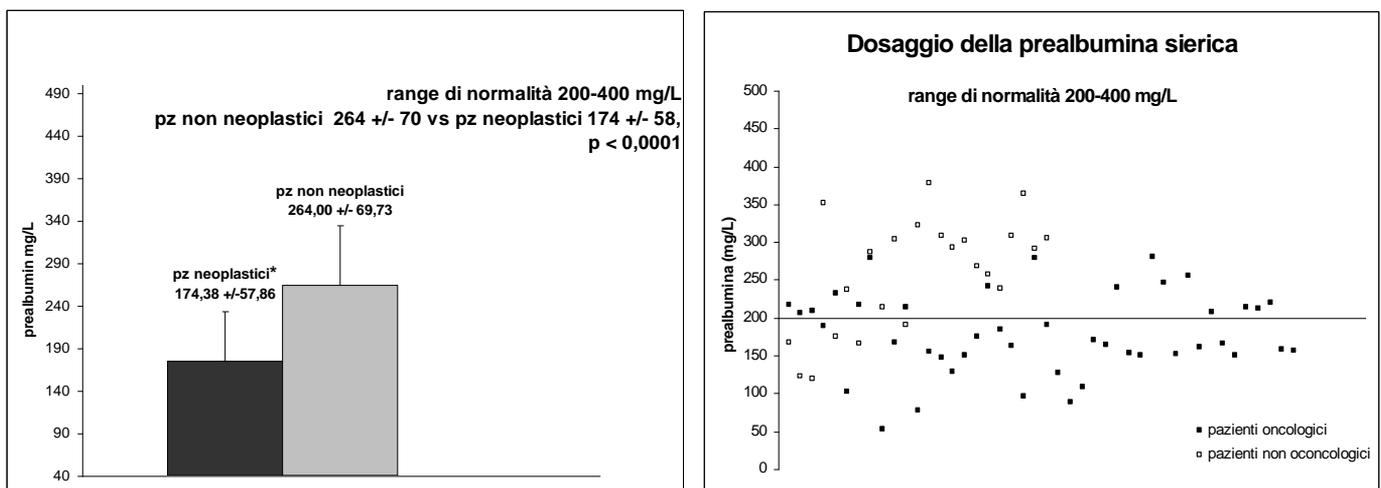


Fig 6. Medie dei valori della concentrazione preoperatoria della prealbumina (mg/L) nei pazienti non neoplastici e nei pazienti neoplastici

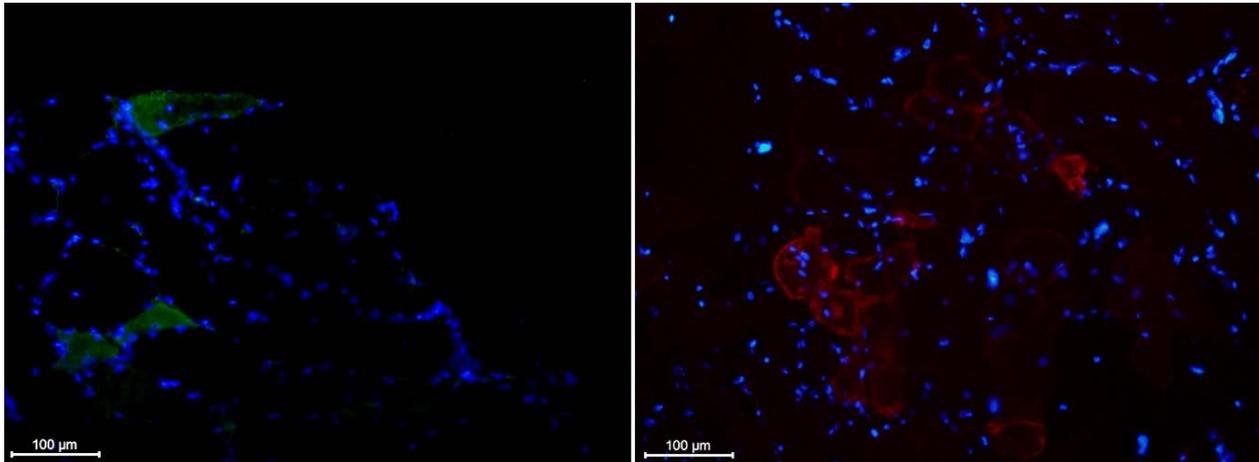


Fig 7. Caratterizzazione immunocistochimica della isoforma embrionale della miosina (MHCemb) e della molecola di adesione cellulare neuronale (NCAM) nel retto dell'addome dei pazienti affetti da neoplasia colo-rettale. Barra di calibrazione 100 µm. A, fibre esprimenti MHCemb (verdi); B, fibre esprimenti NCAM (rosse).

monoclonali infiltranti esprimenti l'antigene leucocitario comune e l'espressione delle proteine associate al sarcolemma laminina e distrofina.

3.3.3.1 Espressione di marcatori di rigenerazione

Sezioni seriali sono state incubate per un'ora a temperatura ambiente con anticorpi monoclonali murini (Novocastra, NCL-MHCd diluito 1:20) diretti contro l'isoforma embrionale della catena pesante della miosina (MHCemb) o con anticorpi policlonali di coniglio (Millipore, diluito 1:200) diretti contro la molecola di adesione cellulare neuronale (NCAM). I preparati sono poi stati lavati tre volte (5 min per ogni lavaggio) in tampone TBS/PBS rispettivamente e successivamente incubati con l'anticorpo secondario anti-mouse Fab2 specifico (assorbito in Ig di ratto) coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC) (F2266, Sigma, diluito 1:200) o anti-rabbit Fab2 specifico coniugato con rodamina (Cy3) (Chemicon, diluito 1:200) rispettivamente, per 1 ora a temperatura ambiente. I campioni sono nuovamente stati lavati 2 volte con PBS/TBS (5 min per ogni lavaggio), 1 volta con acqua distillata per 5 minuti e controcolorati con Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), per marcare i nuclei, lavati ulteriormente con acqua, montati con il montante Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako, Glostrup, Denmark) ed osservati al microscopio a fluorescenza (Zeiss). Sulle immagini acquisite sono state contate le miofibre positive per MHCemb e NCAM ed espresse come numero di fibre positive per numero totale di fibre contate nell'intera biopsia.

3.3.3.2 Espressione di proteine del sarcolemma

Sezioni seriali sono state incubate per un'ora a temperatura ambiente con anticorpi monoclonali di coniglio diretti contro la laminina (Sigma, diluito 1:100) e con anticorpi monoclonali murini diretti

contro il peptide sintetico consistente degli ultimi 17 aminoacidi alla regione carbossi terminale della distrofina umana (Novocastra, NCL-DYS2 diluito 1:100). I preparati sono poi stati lavati due volte in tampone PBS (10 min per ogni lavaggio) e incubati rispettivamente con l'anticorpo secondario anti-rabbit Cy3 coniugato (Sigma, diluito 1:200) o con l'anticorpo secondario anti-mouse Fab2 specifico (assorbito in Ig di ratto) FITC coniugato (Sigma, diluito 1:200) per 1 ora a temperatura ambiente. I campioni sono stati nuovamente stati lavati 2 volte con PBS (5 min per ogni lavaggio), controcolorati con Hoechst 33258 per marcare i nuclei, lavati ulteriormente con acqua, montati con il montante Dako Fluorescent Mounting Medium ed osservati al microscopio a fluorescenza (Zeiss).

3.3.3.3 Distribuzione di cellule mono-infocitarie

Sezioni seriali sono state incubate con anticorpi monoclonali murini diretti contro l'antigene leucocitario comune CD45 (Dako, diluito 35 mg/ml in soluzione salina tamponata con fosfato, contenente albumina di siero bovino) per tutta la notte in camera umida. Dopo tre lavaggi in PBS, le sezioni sono state incubate con l'anticorpo secondario anti-mouse IgG biotinilato (Vector Laboratories, diluito in PBS/BSA contenente 5 ml/ml di siero umano) a 4-8 °C per 2 ore. L'attività perossidasi endogena è stata inibita con metanolo contenente perossido d'idrogeno all'1%. Il Complesso Avidina-Biotina (ABC) (Vector Laboratories) coniugato con la perossidasi è stato successivamente preparato secondo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice ed applicato sulle sezioni a temperatura ambiente per un'ora. L'immunopositività è stata localizzata mediante l'utilizzo del substrato cromogeno diaminobenzidina (0.025% wt/vol) diluita in PBS e perossido d'idrogeno allo 0.1%. Dopo un lavaggio, i nuclei sono stati controcolorati per 5 minuti

Serum and tissue markers in colorectal cancer at onset

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (3): 125-146

a temperatura ambiente con blu di Toluidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); le sezioni sono state quindi montate con mezzo di montaggio (Dako, Glostrup, Denmark) ed osservate al microscopio ottico.

3.3.4 Morfometria

Le immagini dei preparati istologici sono state acquisite con un microscopio Zeiss collegato ad una telecamera Leica DC 300F, agli stessi ingrandimenti e nelle condizioni utilizzate per acquisire una barra di calibrazione. Le figure sono state montate usando Adobe Photoshop 6.0, e i calcoli matematici eseguiti con Excel (Microsoft office 2000 professional). Sono stati calcolati i diametri minimi delle miofibre, contate le fibre rigeneranti esprimenti MHCemb e NCAM e le fibre con distribuzione anomala dei mio nuclei. Il numero delle fibre con nuclei internalizzati è stato espresso in percentuale rispetto al numero di miofibre con il nucleo nella normale posizione subsarcolemmale. Le analisi morfometriche sono state eseguite con il programma Scion Image for Windows versione Beta 4.0.2 (della 2000 Scion Corporation), un software gratuito per analisi d'immagine scaricato dal sito web: www.scioncorp.com, derivato da quello messo a punto dal National Institutes of Health di Bethesda, Maryland, USA.

3.4. Analisi sierologiche

quadricipite Una provetta di sangue contenente EDTA è stata prelevata in sede operatoria prima dell'intervento chirurgico, ed immediatamente centrifugata a 3000 rpm per 10 minuti; aliquote di siero da 500 µl sono state stoccate in freezer a -20°C per essere utilizzate successivamente per il dosaggio sierologico di marcatori di rigenerazione muscolare (sNCAM) e di indicatori dello stato nutrizionale (prealbumina).

3.4.1 Analisi immunoenzimatiche

Il siero dei pazienti e dei controlli (preventivamente stoccato a -20°C) è stato scongelato ed utilizzato per quantificare la presenza dell'immunopeptide derivato dalla molecola di NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) espressa dalle fibre muscolari, quale marcatore umorale di rigenerazione muscolare. A tale scopo è stato utilizzato, secondo le indicazioni del produttore, il RayBio® Human NCAM-1 ELISA Protocol che utilizza un anticorpo monoclonale ricombinante specifico per l'isoforma solubile dell'NCAM-1 umana. Tutti i campioni e i reagenti sono stati portati a temperatura ambiente (18-25°C) prima di essere utilizzati. 2 µl di ciascun campione sono stati aggiunti a 98 µl di diluente B (Item E)

Tabella 4. Correlazioni tra la percentuale di fibre con nuclei internalizzati e caratteristiche cliniche e fenotipiche della neoplasia

	Fibre con nuclei internalizzati (%) Mediana (IQR)	p-value
Età dei pazienti (ρ)	-0.14	0.33
Sesso		
M	16.0 (8.7-22.6)	0.11
F	9.1 (5.1-18.9)	
BMI (ρ)	0.21	0.14
pT		
1-2	15.0 (6.0-20.0)	0.96
3-4	12.6 (6.6-21.2)	
pN		
0	15.5 (8.2-22.6)	0.05
1-2	7.1 (4.6-18.3)	
N+ (ρ)	-0.30	0.03
pM		
0	12.8 (6.0-21.5)	0.95
1	19 (10.9-19.7)	
Invasione vascolare		
Assente	12.6 (8.4-21.0)	0.13
Presente	6.6 (4.9-18.8)	

IQR: intervallo interquartile; BMI: Body Mass Index; ρ: coefficiente di correlazione Rho di Spearman; N.S.: non significativo.

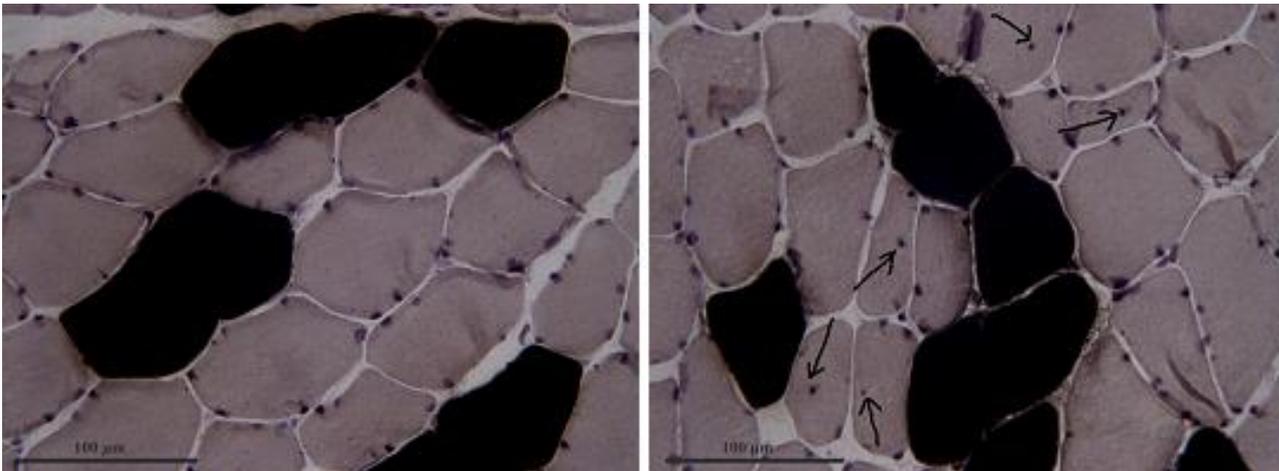


Fig 8. *Analisi istochimica di retto dell'addome normale e di pazienti affetti da neoplasia del colon retto. Barra di calibrazione 100 µm. ATPasi miosinica pH 4,35 rispettivamente di muscolo normale (A) e di muscolo di pazienti con neoplasia (B). Nei pazienti, le fibre con distribuzione anomala dei mionuclei sono preferenzialmente di tipo rapido (bianche).*

(diluizione 1:50) , risospesi e vortexati. 100 µl di ciascuno standards e di ciascun campione sono stati caricati negli appropriati pozzetti, coperti e lasciati incubare per 2h e 30 min a temperatura ambiente. In questa fase l'NCAM presente nei campioni è trattenuto nel pozzetto dall'anticorpo coattato alla piastra. Al termine la piastra è stata svuotata e risciacquata 4 volte con soluzione di lavaggio 1x. Dopo l'ultimo risciacquo i pozzetti sono stati aspirati. Si sono quindi aggiunti 100 µl di anticorpo biotinitato anti-NCAM-1 umano e lasciato incubare per 1h a temperatura ambiente. Al termine la piastra è stata svuotata e risciacquata 4 volte con soluzione di lavaggio 1x come sopra. Si sono quindi aggiunti 100 µl di soluzione HRP coniugata con streptavidina e lasciato incubare 45 min a temperatura ambiente. Al termine la piastra è stata svuotata e risciacquata 4 volte con soluzione di lavaggio 1x come prima. Sono quindi stati aggiunti 100 µl del substrato TMB e lasciato incubare per 30 min. In questa fase il colore si sviluppa in proporzione alla quantità di NCAM-1 che si è legato. Al termine sono stati aggiunti 50 µl di soluzione di stop e si è andati a leggere i valori di assorbanza alla lunghezza d'onda di 450 nm. Si è costruita la curva di riferimento in base ai valori degli standards e tramite questa e i valori di DO (densità ottica) dei campioni si è ricavata la concentrazione di NCAM-1 presente in ciascun campione. Tutte le analisi sono state effettuate in doppio.

3.4.2 Analisi immunonefelometriche

I dosaggi quantitativi con metodo nefelometrico della prealbumina preoperatoria e della Proteina C-Reattiva (PCR) sono stati effettuati presso il Dipartimento di Medicina di Laboratorio dell'Azienda Ospedaliera di Padova, mediante utilizzo del sistema Dimension Vista® come descritto nel Manuale Operatore dello

strumento. Le proteine contenute nel siero formano degli immunocomplessi reagendo con gli anticorpi specifici. Sfruttando il fenomeno della diffrazione della luce che questi immunocomplessi provocano, si è in grado, per mezzo del nefelometro, di misurare l'intensità della luce diffratta, che risulta proporzionale alla concentrazione della proteina indagata presente nel campione in esame. La valutazione quantitativa avviene per confronto con uno calibratore a concentrazione nota. Si è atteso che i reagenti ed i campioni raggiungessero la temperatura ambiente (15°-25°C) prima di utilizzarli. Tutte le fasi sono state eseguite automaticamente dallo strumento che effettua il campionamento, l'erogazione del reagente, la miscelazione e il processo di analisi. Per il dosaggio della prealbumina preoperatoria è stato utilizzato il PREALB Flex®reagent cartridge,Cod. K7064; l'intervallo di misura analitica è di 0,03-0,6 g/L e l'intervallo di riferimento è di 200-400 mg/L. Per il dosaggio della PCR è stato utilizzato il CRP Flex®reagent cartridge,Cod. K7032; l'intervallo di misura analitica è di 2,9-190 mg/L e l'intervallo di riferimento è di 0-5 mg/L.

3.4.3 Analisi immunofotometriche

quadricipite La determinazione quantitativa della creatinichinasi (CK) su siero è stata effettuata presso il Dipartimento di Medicina di Laboratorio dell'Azienda Ospedaliera di Padova, con l'analizzatore cobas c 702 secondo il metodo raccomandato dall'IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) [21, 24,33]. Il test misura fotometricamente la velocità di formazione di NADPH che è direttamente proporzionale all'attività della CK. L' intervallo di riferimento per la CK è di 0-190 U/L.

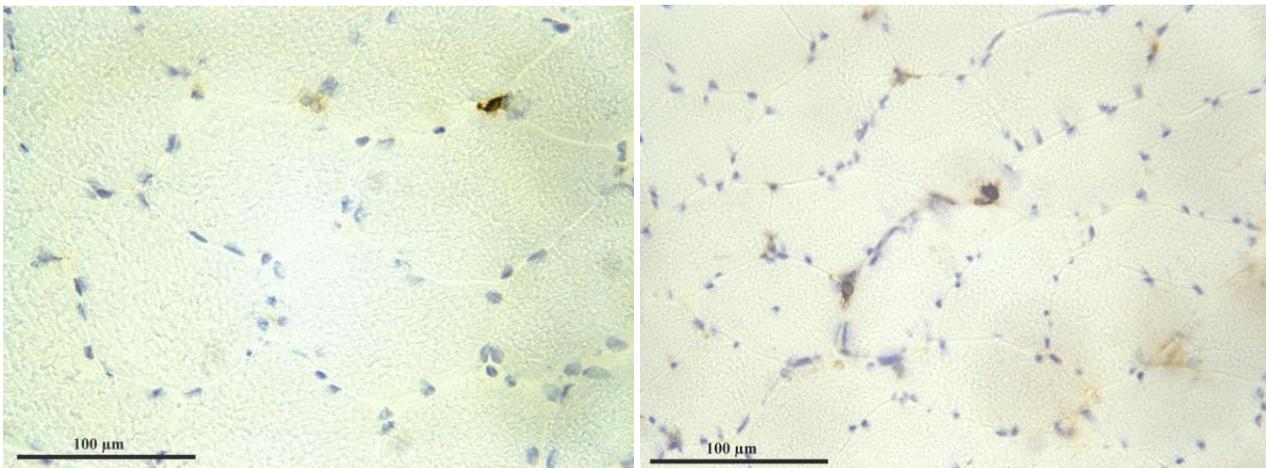


Fig 9. Analisi istochimica di infiltrati monolinfocitari esprimenti l'antigene CD45. Barra di calibrazione 100 µm. A, muscolo normale; B muscolo di pazienti con neoplasia. Non sono presenti cellule monolinfocitarie (marroni) infiltranti le fibre muscolari. Qualche rara cellula CD45 positiva è stata identificata all'interno di piccoli vasi e nella matrice extracellulare.

3.5. Dati operatori ed anatomopatologici

Di tutti i pazienti sono stati registrati e inseriti in un data base il tempo operatorio, il tipo di tecnica chirurgica ed anestesiológica usata, la sede della neoplasia e la successiva caratterizzazione fenotipica della neoplasia asportata. I pazienti sono stati seguiti con follow-up ambulatoriale e con esami radiologici e strumentali.

3.6. Analisi statistiche

quadricipite I dati numerici continui sono stati espressi come Mediana ed Intervallo Interquartile (IQR). I dati numerici continui sono stati confrontati tra i due gruppi in studio con il test non parametrico di Wilcoxon, mentre per i dati categoriali è stato usato il test di Fisher. L'associazione tra due variabili numeriche continue è stata valutata con il coefficiente Rho di Spearman. E' stato considerato significativo un valore della p inferiore a 0.05. L'analisi statistica è stata effettuata con il programma statistico SAS 9.1 ed il linguaggio R 2.5.

4. Risultati

Presso l'Unità di Chirurgia Coloproctologica della Clinica Chirurgica I dell'Università degli Studi di Padova, dal mese di Luglio 2008 al mese di Novembre 2012, 50 pazienti (28maschi/22 femmine), di età mediana di 67 anni [Intervallo InterQuartile (IQR): 61-70], prima della resezione coloretale per neoplasia del colon retto, sono stati sottoposti a biopsia del muscolo retto dell'addome. In tabella 1 sono evidenziate le caratteristiche demografiche dei pazienti e nella tabella 2 la sede e la stadiazione post-operatoria della neoplasia. Nello stesso periodo 25 pazienti non neoplastici (18 maschi/7 femmine) (p= N.S) sottoposti a interventi chirurgici per patologie benigne non infiammatorie (2 laparoscopie esplorative, 4

colecistomie, 1 colectomia per stipsi cronica e 18 ernioplastiche inguinali) sono stati sottoposti alla medesima biopsia. L'età mediana dei controlli era di 61 anni (IQR: 35-66) (p=N.S). Tutti i pazienti neoplastici e non neoplastici erano asintomatici per mialgie, astenia e debolezza muscolare. 25 pazienti neoplastici (50%) erano stati già sottoposti a precedenti interventi chirurgici addominali; dall'anamnesi farmacologica risultava che il 20% di essi assumeva farmaci potenzialmente miopatici (esempio: statine, ipoglicemizzanti). Sono state seguite 28 (56%) resezioni del colon retto per via laparoscopica e 22 per via laparotomica; la durata mediana dell'intervento è stata di 137,5 minuti (IQR: 119,5-150). Nel gruppo dei pazienti abbiamo osservato un numero significativamente elevato di fibre con nuclei internalizzati [39,43] rispetto ai pazienti non neoplastici, in assenza di atrofia cellulare (Tabella 3 e Figura 3). Abbiamo inoltre osservato un numero maggiore di fibre con nuclei internalizzati in quei pazienti neoplastici che assumevano farmaci mitossici rispetto ai pazienti che non li assumevano. In particolare l'88% dei pazienti presentava una percentuale patologica (cioè maggiore del 5%) di fibre muscolari con nuclei internalizzati. Nei pazienti sono state individuate un maggior numero di fibre rigeneranti esprimenti MHCemb (12 %) e soprattutto NCAM (40%) rispetto ai controlli (Tabella 3 e Figura 7). All'analisi multivariata, al netto dell'effetto dell'età, si è confermata la significatività per la maggior percentuale di fibre con nuclei internalizzati nei pazienti oncologici rispetto ai controlli non oncologici (p=0,0006), mentre non ha significatività statistica la differenza nell'espressione del marcatore di miogenesi NCAM. Il dosaggio sierico dell'sNCAM-1 non ha mostrato differenze significative tra pazienti

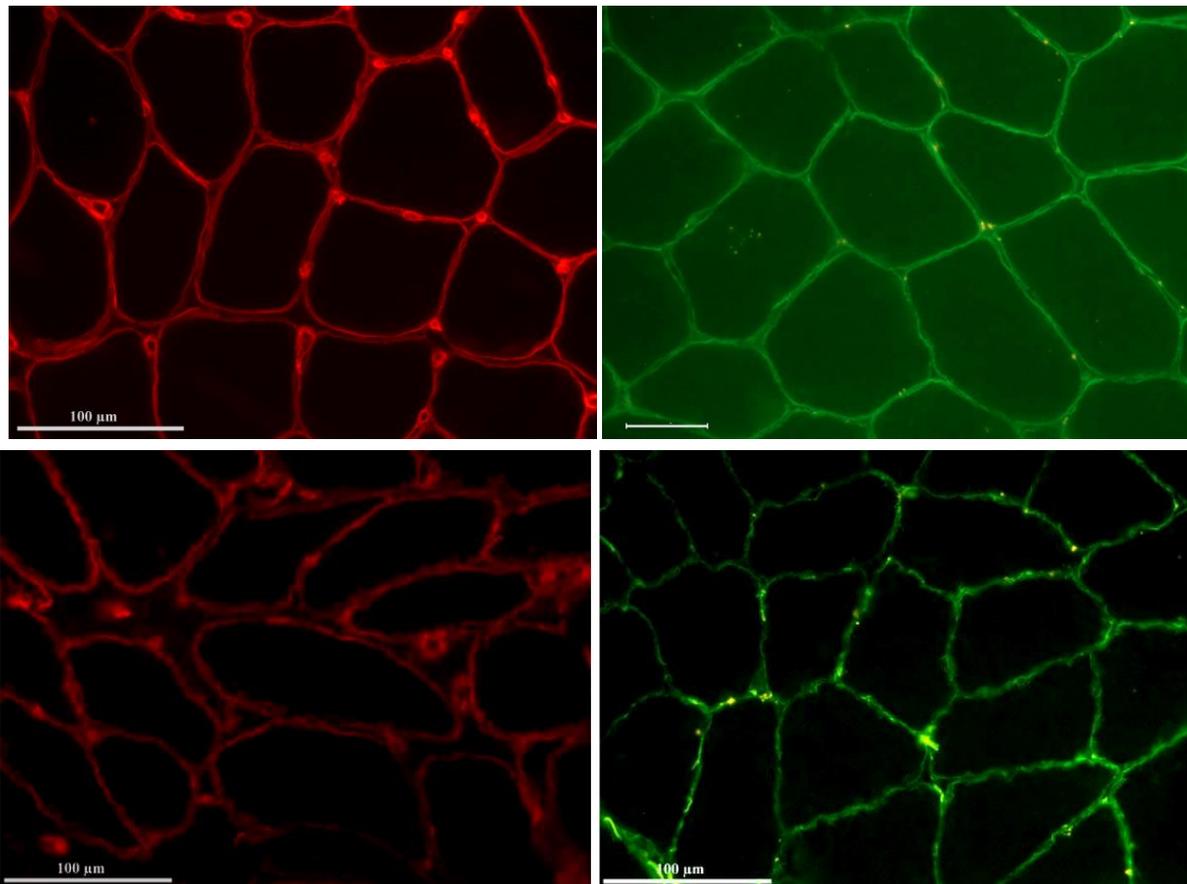


Fig 10. Caratterizzazione immunoistochimica della laminina e della distrofina nel muscolo retto dell'addome di pazienti non neoplastici ed affetti da neoplasia coloretale. Pannelli superiori, muscolo di pazienti non oncologici. Pannelli inferiori, retto dell'addome di pazienti con neoplasia. Nei soggetti affetti da neoplasia, la distribuzione delle proteine associate al sarcolemma, laminina (a sinistra, in rosso) e distrofina (a destra, in verde), è tortuosa e discontinua, rispetto a quanto si osserva nel muscolo di soggetti non oncologici (pannelli superiori). Barra di calibrazione 100 µm.

oncologici e controlli non oncologici, evidenziando tuttavia una correlazione, seppur moderata, con la percentuale di nuclei internalizzati nei pazienti oncologici (coefficiente di Pearson = 0,4). L'analisi istochimica dell'attività ATPasica suggerisce che le fibre con nuclei internalizzati siano prevalentemente di tipo rapido (Figura 8); si è inoltre osservata l'assenza di infiltranti monocellulari positivi per l'antigene leucocitario comune CD45 [45]. Qualche rara cellula CD45 positiva è stata identificata all'interno di piccoli vasi e nella matrice extracellulare (Figura 9). All'analisi immunoistochimica per le proteine associate al sarcolemma abbiamo osservato che nei soggetti affetti da neoplasia, la distribuzione della laminina e della distrofina è tortuosa e discontinua, con un segnale più debole o interrotto, rispetto a quanto si osserva nel muscolo normale. (Figura 10). Nel gruppo dei pazienti neoplastici l'aumentato numero di fibre con nuclei internalizzati non è correlato al tipo di intervento, di anestesia, né alla assunzione di farmaci

miotossici o precedenti interventi chirurgici addominali, né alla sede della neoplasia, né ai comuni marcatori di neoplasia impiegati nella pratica clinica (CEA). Nei pazienti con neoplasia metastatizzata ai linfonodi abbiamo evidenziato un numero di fibre con localizzazione anomala dei mionuclei significativamente minore rispetto a quelli esenti da metastasi linfonodali ($p=0,05$), con una correlazione inversa allo stato linfonodale ($p=0,03$) (Tabella 4). I dosaggi sierici della PCR e della CK sono risultati lievemente aumentati solo in alcuni pazienti senza alcuna correlazione con la presenza di fibre muscolari con nuclei internalizzati o espressione di markers di rigenerazione. I valori sierici della prealbumina preoperatoria sono inferiori, ed in modo statisticamente significativo, nei pazienti oncologici rispetto ai controlli non oncologici, risultando inferiori all'ambito di normalità (Figura 6).

5. Discussione

Il cancro coloretale rappresenta la seconda causa di morte per cancro in Europa ed è la terza neoplasia più frequentemente diagnosticata negli USA. Una delle più temibili complicanze delle neoplasie, che fatalmente conduce alla morte, è la cachessia neoplastica, che si sviluppa negli stadi terminali ed è caratterizzata da una importante perdita di massa muscolare con conseguente astenia e debolezza muscolare [5, 32,36,42]. Ben note sono le alterazioni cui il muscolo scheletrico va incontro negli stadi avanzati della malattia neoplastica, così come dopo chemioterapia e radioterapia; altrettanto conosciuta è l'associazione tra le neoplasie e sindromi autoimmuni come le miositi e le dermatomiositi [20,28]. In un nostro precedente studio su pazienti con miositi e polimiositi associate a cancro, abbiamo evidenziato per la prima volta la presenza, su biopsie muscolari in un gruppo di pazienti affetti da cancro del colon retto, ma senza miosite, di alterazioni miopatiche con caratteristiche simili a quelle presenti nelle miositi [44]. Allo scopo di verificare se i pazienti affetti da neoplasia del colon retto, normopeso e asintomatici per astenia e debolezza muscolare, presentino quindi, già a stadi precoci di malattia, delle alterazioni del tessuto muscolare, sono state prelevate biopsie del muscolo retto dell'addome in corso di resezioni del colon retto. Con le analisi istologiche, istochimiche ed immunohistochemiche condotte su sezioni criostatiche ottenute dalle biopsie, abbiamo osservato che i pazienti presentavano una percentuale significativamente maggiore rispetto ai controlli di fibre muscolari con una ridistribuzione anomala dei mio nuclei, delocalizzati rispetto alla normale sede sub-sarcolemmale verso il centro della fibra (miofibre con nuclei internalizzati o centrali), e fibre rigeneranti esprimenti sia l'isoforma embrionale della catena pesante della miosina (MHCemb), sia la molecola di adesione neuronale (NCAM), due classici marcatori di miogenesi rigenerativa muscolare. In particolare circa il 88% dei pazienti presentava una percentuale di fibre con nuclei internalizzati patologica maggiore cioè del 5% delle fibre totali [27]. Sostanzialmente assenti sono tuttavia le miofibre degeneranti o francamente necrotiche. Durante la miogenesi i miotubi presentano nuclei centrali, che in seguito migrano perifericamente in sede sub-sarcolemmale. Anche nella miogenesi rigenerativa si hanno miofibre con nuclei centrali, ma la presenza di questa caratteristica in fibre mature è un indicatore aspecifico di miopatia, neurogena, primitiva o secondaria. Esistono inoltre delle condizioni genetiche come le miopatie centro-nucleate o alcune forme di distrofia in cui questo reperto è presente, così come nelle miositi autoimmuni. Rimane sconosciuto l'esatto meccanismo che determina la migrazione dei mio nuclei. Nelle malattie genetiche centronucleate sembra sia una alterata/bloccata maturazione delle fibre muscolari o, in altri casi, una risposta ad un danno

neurologico [27,30]. In modelli animali di cachessia neoplastica si evidenziano fibre muscolari centro nucleate, ma esse sono piuttosto delle piccole fibre muscolari rigeneranti con la presenza di un significativo infiltrato infiammatorio nella matrice extracellulare [25]. Nel nostro studio non abbiamo evidenziato correlazione tra fibre presentanti una distribuzione anomala dei mio nuclei con l'età dei pazienti; tale reperto, infatti, non viene normalmente riscontrato con tale frequenza nei soggetti anziani, risultando essere associato a malattie genetiche, metaboliche o neurologiche [18]. L'analisi istochimica dell'attività ATPasica ha inoltre evidenziato che le fibre con nuclei internalizzati sono prevalentemente di tipo rapido, suggerendo che la ridistribuzione dei nuclei all'interno delle miofibre non sia né focale né casuale, ma ristretta ad un sottogruppo di fibre muscolari. Altra interessante osservazione è l'assenza di infiltranti monocellulari positivi per l'antigene leucocitario comune CD45. Nei modelli di cachessia e nelle biopsie muscolari di pazienti cachettici si è osservato che le fibre che vanno incontro ad atrofia e ad alterazioni delle proteine di membrana sono proprio le fibre di tipo rapido [1]. Tale osservazione crea un interessante nesso tra le alterazioni miopatiche da noi qui rilevate e gli stadi avanzati di cachessia neoplastica. A differenza della cachessia manifesta però nei nostri pazienti non abbiamo evidenziato significativi infiltrati infiammatori né atrofia delle fibre muscolari. I comuni marcatori di danno muscolare (PCR e CK) sono risultati sostanzialmente nella norma, confermando che il danno muscolare è estremamente precoce, non sufficiente a creare necrosi delle miofibre, e che lo stato infiammatorio cronico tipico della sindrome cachettica non può qui essere considerato come elemento determinante. Il riscontro di fibre rigeneranti esprimenti MHCemb e NCAM è un elemento tipico di un processo di rigenerazione muscolare che è iniziato già da qualche tempo, sicuramente precedentemente alla biopsia. Ciò permette di concludere che il danno muscolare e la miopatia da noi osservata non sono legati né alle modalità del prelievo biopsico effettuato durante l'intervento chirurgico, né all'attivazione di processi pro-infiammatori quali quelli che si osservano nei modelli murini di sindrome cachettica da neoplasia del colon-retto [25]. Non è stata riscontrata alcuna correlazione con la sede della neoplasia, né con l'assunzione di farmaci miotossici, né con le comuni caratteristiche fenotipiche studiate, suggerendo che è la presenza della neoplasia stessa ad indurre la miopatia, più che le sue caratteristiche. Abbiamo comunque osservato che le biopsie dei pazienti neoplastici che prendevano farmaci potenzialmente miotossici (statine) presentavano un numero di nuclei internalizzati maggiore rispetto a quelli che non li assumevano, indicando che l'uso di questi farmaci ha un effetto sinergico con i fattori miopatici oncologici sconosciuti.

Serum and tissue markers in colorectal cancer at onset

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (3): 125-146

Inaspettatamente abbiamo riscontrato una correlazione inversa tra il numero di fibre con nuclei internalizzati e presenza di metastasi linfonodale nei pazienti neoplastici. La neoplasia metastatica cioè presenta segni di miopatia più attenuati, con un minor numero di fibre con ridistribuzione anomala dei mio nuclei. Sembra quindi che le alterazioni muscolari da noi evidenziate siano da riferirsi ad uno stadio precoce di malattia tumorale. La miopatia sembra cioè caratterizzare uno stadio precoce della malattia neoplastica, potrebbe cioè far parte di una risposta secondaria del tessuto muscolare scheletrico a meccanismi difensivi anti-neoplastici (verosimilmente pro-apoptotici e quindi non-infiammatori) nella fase pre-invasiva della neoplasia. Parlano in questo senso anche l'assenza di atrofia, di miofibre degeneranti o francamente necrotiche, di un manifesto stato infiammatorio, e di neovascolarizzazione. Nel suo complesso ciò ci fa ipotizzare che alla base ci sia un meccanismo adattativo delle miofibre alla presenza della neoplasia e che all'avanzare della stessa, entrino in gioco altri fattori di origine immunitaria, tumorale e infiammatoria che determinano le alterazioni muscolari riscontrate nella cachessia manifesta. Per valutare l'eventuale progressione della miopatia verso la forma cachettica abbiamo dosato, nel siero di questi pazienti, la prealbumina, un indicatore dello stato nutrizionale. Assai interessante è stata l'osservazione della diminuzione del valore della prealbumina sierica preoperatoria che indica un'alterazione del turnover proteico in questi pazienti ad uno stadio neoplastico precoce ed asintomatico e con valori di BMI nella norma. Altrettanto interessante potrebbe rivelarsi la futura osservazione di questi pazienti (follow-up), tenendo in considerazione gli studi in corso sul valore predittivo della prealbumina sierica nel manifestarsi di recidive nei pazienti operati per tumore del colon retto. Il legame tra la miopatia da noi rilevata e la cachessia è rafforzato anche dal riscontro di alterazioni delle proteine del sarcolemma, nello specifico laminina e distrofina. All'analisi immunisto chimica abbiamo, infatti, osservato che in alcune biopsie, soprattutto in quelle di pazienti con una percentuale maggiore rispetto ai controlli non neoplastici di fibre con nuclei internalizzati, la distribuzione delle due proteine è tortuosa e discontinua, e con caratteristiche simili a quelle descritte in pazienti cachettici ed in biopsie muscolari in modelli murini di cachessia [1]. Ad oggi i migliori risultati ottenuti nella cura del cancro coloretale sono stati raggiunti grazie a diagnosi sempre più precoci, in prima istanza con i programmi di screening. E' quindi molto attuale la ricerca di biomarcatori diagnostici da poter impiegare in pratica clinica su un'ampia popolazione. Le alterazioni muscolari da noi riscontrate e per ora individuabili solo con l'analisi microscopica di tessuto muscolare biotico, potrebbero risultare a tale proposito di estremo interesse. L'identificazione, infatti, di

caratteristici profili bioumorali correlabili alle osservazioni istopatologiche permetterebbe di fornire quella che potrebbe essere definita, sia pure impropriamente, una vera e propria "biopsia molecolare". A tal fine abbiamo cercato di individuare potenziali nuovi biomarcatori da poter poi correlare con i risultati ottenuti. Numerosi studi indicano in una serie di proteine di adesione cellulare (CAM) dei fattori prognostici di cancro del colon-retto. Considerando, quindi, l'elevata percentuale di fibre NCAM positive presenti nelle biopsie muscolari dei pazienti neoplastici, abbiamo dosato nel siero un peptide derivante dalla molecola di NCAM. I risultati ottenuti indicano una correlazione, seppur moderata, tra sNCAM e nuclei internalizzati e, a conferma dei risultati precedenti, una correlazione inversa con il numero dei linfonodi metastatici. Attualmente i programmi di screening portano all'attenzione del chirurgo pazienti con neoplasie a stadi sempre più precoci, rendendo necessario un trattamento personalizzato, con attenta valutazione dei rischi e benefici correlati all'atto chirurgico ed alla progressione della malattia. Dibattuti rimangono per esempio i fattori da considerare come predittivi di alto rischio di metastatizzazione in pazienti sottoposti ad asportazione endoscopica di polipi cancerizzati e che beneficerebbero quindi di una radicalizzazione chirurgica. Interessante risulta la correlazione inversa da noi riscontrata tra questa miopatia e la presenza di metastasi linfonodali nei pazienti sottoposti a resezione. La biopsia muscolare in pazienti sottoposti ad asportazione endoscopica di polipi cancerizzati potrebbe perciò divenire un ulteriore marcatore predittivo di bassa metastatizzazione linfonodale, utilizzabile nella decisione terapeutica per questo gruppo di pazienti sempre più numerosi nella pratica clinica. Queste nostre preliminari osservazioni potrebbero quindi avere una futura applicazione clinica nel fornire un nuovo marcatore diagnostico e prognostico di malattia in particolari sottogruppi di pazienti, per esempio affetti da malattie infiammatorie con stenosi coliche o ad alto rischio, per cui gli attuali mezzi diagnostici e di screening risultano problematici.

6. Conclusioni e sviluppi futuri

Queste osservazioni nel loro insieme indicano che i pazienti con neoplasia coloretale all'esordio presentano una miopatia subclinica caratterizzata dal punto di vista istologico da fibre muscolari scheletriche del muscolo retto dell'addome con nuclei internalizzati e miofibre rigeneranti e che tale miopatia presenta una correlazione inversa alla presenza di metastasi linfonodale nella neoplasia asportata e valori inferiori alla norma di prealbumina (nota anche come transtiretina) preoperatoria. La miopatia sarebbe correlata con uno stadio precoce di malattia e potrebbe essere interpretata come una risposta secondaria del tessuto muscolare scheletrico a meccanismi difensivi

Serum and tissue markers in colorectal cancer at onset

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (3): 125-146

anti-neoplastici (verosimilmente pro-apoptotici e quindi non-infiammatori) nelle fasi preinvasive della neoplasia, suggerendo un loro impiego clinico coordinato come biomarcatori diagnostici precoci e/o prognostici di neoplasia. Uno studio più dettagliato ed analitico sul potenziale coinvolgimento della morte cellulare per apoptosi nello sviluppo di questa miopatia associata a neoplasia all'esordio verranno condotti sia a livello tissutale che sierologico, allo scopo di identificare altri biomarcatori utili nei programmi di screening del cancro coloretale all'esordio.

Corresponding Author

Nicoletta Adami, Department of Biomedical Sciences University of Padova, Italy and Ludwig Boltzmann Institute of Electrical Stimulation and Physical Rehabilitation, Vienna, Austria.
E-mail: nicoletta.adami@unipd.it

References

- [1] Acharyya S, Butchbach MER, Sahenk Z et al. Dystrophin glycoprotein complex dysfunction: a regulatory link between muscular dystrophy and cancer cachexia. *Cancer Cell* 2005; 8: 421-432.
- [2] Allen DL, Roy RR, Edgerton VR. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve* 1999; 22: 1350-1360.
- [3] Angel MJ, Bril V, Shannon P, Herridge MS. Neuromuscular function in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *Can J Neurol Sci.* 2007; 34: 427-432.
- [4] Argiles JM, Busquets S, Felipe A, Lopez-Soriano FJ. Molecular mechanisms involved in muscle wasting in cancer and ageing :cachexia versus sarcopenia. *Int J Bioch Cell Biol* 2005; 37: 1084-1104.
- [5] Beck FK, Rosenthal CT. Prealbumin: a marker for nutritional evaluation. *Am Fam Physician* 2002; 65: 1575-1579.
- [6] Betto R, Biral D, Sandonà D. Functional roles of dystrophin and of associated proteins. New insights for the sarcoglycans. *Ital J Neurol Sci.* 1999; 20: 371-379.
- [7] Beuerle JR, Azzazy HME, Styba G, Duh SH, Christenson RH. Characteristics of myoglobin, carbonic anhydrase III ratio in trauma, exercise, and myocardial infarction. *Clinica Chimica Acta* 2000; 294: 115-128.
- [8] Bozzetti F. A critical reappraisal of the definition of cancer cachexia and proposal for a staging system. *Nutr Therapy & Metab* 2008; 26: 109-117
- [9] Brookes G. Nutritional status in head and neck cancer: observation and implication. *Clin Otolaryngology Allied Sciences* 1982; 8: 211-220.
- [10] Bujanda L, Cosme A, Gil I, Arenas-Mirave JI. Malignant colorectal polyps. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3103-3111.
- [11] Capkovi KL, Stevenson S, Johnson MC, Thelen JJ, Cornelison DD. Neural cell adhesion molecule (NCAM) marks adult myogenic cells committed to differentiation. *Exp Cell Research* 2008; 314: 1553-1565.
- [12] U Cavallaro, G Christofori Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 118-132.
- [13] Coakley JH, Nagendran K, Yarwood GD, Honavar M, Hinds CJ. Patterns of neurophysiological abnormality in prolonged critical illness. *Intensive Care Med* 1998; 24: 801-807.
- [14] Coma M, Vincente R, Busquets S, Carbò N, Tamkun MM, Lopez-Soriano FJ. *FEBS Lett.* 2003; 536: 45-50.
- [15] Costelli P, Muscaritoli M, Moore-Carrasco R et al. Skeletal muscle wasting in tumor-bearing rats is associated with MyoD down-regulation. *Int J Oncol* 2005; 26: 1663-1668.
- [16] Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, Starling N. Colorectal cancer. *Lancet* 2010; 375: 1030-1047.
- [17] Evans WJ, Morley JE, Argile's J. Cachexia: a new definition. *Clinical Nutrition* 2008; 27: 793-799.
- [18] Faulkner JA, Larkin LM, Claflin DR et al. Age-related changes in the structure and function of skeletal muscles. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 1091-1096.
- [19] Gellad ZF, Provenzale D. Colorectal cancer: national and international perspective on the burden of disease and public health impact. *Gastroenterology* 2010; 138: 2177-2190.
- [20] Hill CL, Zhang Y, Sigurgeirsson B, Pukkala E, Mellekjær L, Airio A, Evans SR. Frequency of specific cancer types in dermatomyositis and polymyositis: a population based study. *Lancet* 2001; 357: 96-100.
- [21] Horder M, Elser RC, Gerhardt M et al. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 7. IFCC method for Creatine Kinase. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991; 29: 435-456.
- [22] Huang Q, Nai YJ, Jiang ZW, Li JS. Change of growth hormone-insulin-like growth factor-I axis in patients with gastrointestinal cancer: related to tumor type and nutritional status. *Br J Nutr* 2005; 93: 853-858.

Serum and tissue markers in colorectal cancer at onset

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (3): 125-146

- [23] Kehler T, Curkovic B. Polymyalgia rheumatic and colon malignancy: case report. *Clin Rheumatol* 2006; 25: 764-765.
- [24] Klauke R, Schmidt E, Lorentz K. Recommendations for carrying out standards ECCLS procedures (1998) for the catalytic concentrations of Creatine Kinase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and γ -glutamyltransferase at 37°C. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1993; 31: 901-909.
- [25] Mehl KA, Davis JM, Berger FG, Carson JA. Myofiber degeneration/regeneration is induced in the cachectic ApcMin/+ mouse. *J Appl Physiol* 2005; 99: 2379-2387.
- [26] Mussini I, Favaro G, Carraro U. Maturation, dystrophic changes and the continuous production of fibers in skeletal muscle regenerating in the absence of nerve. *J Neuropathol Exp Neurol* 1987; 46: 315-331.
- [27] Pierson CR, Tomczak K, Agrawal P, Moghadaszadeth B, Beggs AH. X-linked myotubular and centronuclear myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64: 555-564.
- [28] Raccanelli V, Prete M, Minoia C, Favoino E, Perosa F. Rheumatic disorders as paraneoplastic syndromes. *Autoimmunity Rev* 2008; 7: 352-358.
- [29] Ravasco P, Monteiro I, Camilo M. *Cancer Investigation*. 2007; 25: 308-314
- [30] Romero NB. Centronuclear myopathies: a widening concept. *Neuromuscul Disord* 2010; 20: 223-228.
- [31] Sachiko K, Youichi K, Nobuo I, Takenobu H, Mikizoh O, Takayuki N. Serum levels of soluble ICAM-1 and VCAM-1 predict pre-clinical cancer. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2355-2359.
- [32] Scelsi R. Morfologia del muscolo scheletrico normale e patologia muscolare nella paraplegia da lesione del primo motoneurone. *Basic Appl Myol* 2007; 1: 8-18.
- [33] Schumann G, Bonora R, Ceriotti F et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C- Part 2. Reference procedures for the measurement of catalytic concentrations of Creatine Kinase. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 635-642.
- [34] Takaaki F, Toshinaga S, Hiroki M, Toshihide K, Reina Y, Soichi T, Takayuki A, Hiroyuki K. Serum albumin is superior to prealbumin for predicting short-term recurrence in patients with operable colorectal cancer. *Nutr Cancer* 2012; 64: 1169-1173.
- [35] Takuji T, Mayu T, Takahiro T, Rikako I. Biomarkers for Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 2010; 11: 3209-3225.
- [36] Tisdale MJ. Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2002; 62: 2771-2777.
- [37] Turrin NP, Plata-Salaman CR. Cytokine-cytochine interactions and the brain. *Brain Res Bull* 2000; 51: 3-9.
- [38] Upender M, Chandrakumar S, Vankat R.K, Harvey L.B, William E.G. Development and progression of colorectal neoplasia. *Cancer Biomark* 2010; 9: 235-265
- [39] Vecchiato M, Zampieri S, Merigliano S. Miopatia subclinica in pazienti con neoplasia del colon-retto: caratterizzazione clinico-patologica e ricerca di marcatori tessutali di miopatia. *European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology* 2012; 2: 39-55
- [40] Violetta D-P, Katarzyna G-U, Adam K, Halina K. Prognostic significance of adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1) and VEGF in colorectal cancer patients. *Thrombosis Research* 2012; 129: e47-50.
- [41] Yuji T, Chicao M, Yasuhiro I, Yoshinaga O, Yuki K, Takeshi Y, Kouji T, Masato K. Soluble intercellular adhesion molecule-1 as a prognostic marker for stage II colorectal cancer patients. *Ann Sur Oncol* 2008; 15: 1617-1624.
- [42] Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW. Colorectal cancer. *Lancet* 2005; 365: 153-65.
- [43] Zampieri S, Doria A, Adami N, Biral D, Vecchiato M, Savastano S, Corbianco S, Carraro U, Merigliano S. Subclinical myopathy in patients affected with newly diagnosed colorectal cancer at clinical onset of disease: evidence from skeletal muscle biopsies. *Neurol Res*, 2010; 32: 20-25.
- [44] Zampieri S, Valente M, Adami N, Biral D, Ghirardello A, Rampudda ME, Vecchiato M, Sarzo G, Corbianco S, Kern H, Carraro U, Bassetto F, Merigliano S, Doria A. Polymyositis, dermatomyositis and malignancy: a further intriguing link. *Autoimmun Rev*. 2010; 9: 449-453.
- [45] Zampieri S, Valente M, Adami N, Corbianco S, Doria A, Biral D, VecchiatoM, Carraro U, Merigliano S. Subclinical myopathy in patients affected with early stage colorectal cancer at disease onset: No evidence of inflammatory cells infiltration in the skeletal muscle biopsies harvested during diagnostic laparoscopy. *Basic Appl Myol* 2009; 19: 247-252.