

## **Miopatia subclinica in pazienti con neoplasia del colon-retto: caratterizzazione clinico-patologica e ricerca di marcatori tissutali di miopatia**

Massimo Vecchiato (1), Sandra Zampieri (2), Stefano Merigliano (1)

(1) Department of Oncologic and Gastroenterologic Surgical Scienze (Discog); (2) Laboratory of Translational Myology, Departmente of Biomedical Science, University of Padova, Italy

### **Abstract**

#### **Subclinical myopathy in patients with colorectal cancer: clinical-pathological characterization and search for tissue markers**

Skeletal muscle in patients with cancer undergoes many morphological changes due to immuno-inflammatory factors of tumor origin or treatment. The latest event of these changes is cancer cachexia. Aim of the study is to identify myopathic features in skeletal muscle biopsies from weight stable patients with colorectal cancer and without cachexia or asthenia / weakness, that could possibly provide new diagnostic and prognostic cancer biomarkers. Morphometric analyses and immunohistochemical studies were performed on intraoperative muscle biopsies from patients with colorectal cancer and from weight stable patients undergoing surgery for benign non-inflammatory conditions. A rectus abdominis biopsy was taken in all patients and controls. A correlation between histopathologic findings and clinical characteristics, circulating inflammatory biomarkers and markers of muscle necrosis, surgery data and cancer phenotype were investigated. Forty four patients (21 male/23 female) and 17 controls (6 male/11 female) (p=NS) were studied. In cancer patients' biopsies we observed a subclinical myopathy characterized by an abnormal distribution of myonuclei, which are localized inside the myofiber rather than at the periphery, and by the presence of regenerating muscle fibers. The percentage of myofibers with internalized nuclei is significantly higher in patients (median= 9%, IQR= 3.7-18.8) than in controls (median= 2.7%, IQR= 1.7-3.2) (p=0.0002). In patients we observed an inverse correlation between the number of centronucleated fibers and the presence of node metastasis (N+)(p)=-0.64 (p=0.002). Patients affected with colorectal cancer display early sign of a myopathy, characterized by centronucleated and regenerating myofibers. This myopathy appears to be associated with an early stage of neoplasia and it could be an adaptive response of muscle to cancer. We hope a future application of these findings as a possible early diagnostic and prognostic biomarker of neoplasia.

**Key Words:** Cachexia, centronucleated myopathy, colorectal cancer, skeletal muscle, rectus abdominis

*European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22(1&2): 39-55*

**Riassunto** Il muscolo scheletrico nei pazienti affetti da neoplasia subisce numerose alterazioni morfologiche dovute a fattori infiammatori e immunitari, di origine tumorale o terapie. Lo stadio più grave di queste alterazioni è la sindrome cachettica. Scopo di questo studio è di identificare la presenza su biopsie di muscolo scheletrico di pazienti con neoplasia del colon retto, che non presentano segni di cachessia e sintomi di miopatia, alterazioni miopatiche precoci da poter utilizzare come un nuovo biomarcatore prognostico e

diagnostico. Abbiamo eseguito studi morfometrici e saggi immunoistochimici in pazienti affetti da neoplasia coloretale e in soggetti normopeso sottoposti a intervento chirurgico per condizioni benigne, non infiammatorie, assunti come controlli. In tutti i pazienti è stata eseguita una biopsia del muscolo retto dell'addome. I dati bioptici sono stati correlati con le caratteristiche cliniche dei pazienti, indici bioumoralidi flogosi (PCR) e miopatia (CPK), il tipo e durata dell'intervento e i dati anatomopatologici delle

## Subclinical myopathy in patients with colorectal cancer

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (1&2): 39-55



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA  
II SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN CHIRURGIA GENERALE  
Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Gastroenterologiche  
Clinica Chirurgica Generale I<sup>a</sup>  
Direttore: Prof. Ermanno Ancona

TESI DI SPECIALIZZAZIONE

MIOPATIA SUBCLINICA IN PAZIENTI CON NEOPLASIA DEL  
COLON-RETTO: CARATTERIZZAZIONE CLINICO-  
PATOLOGICA E RICERCA DI MARCATORI TISSUTALI DI  
MIOPATIA

Relatore: Ch.mo Prof. Stefano Merigliano  
Correlatore: Ch.mo Prof. Ugo Carraro

Specializzando: Dott. Massimo Vecchiato

neoplasie asportate. Sono stati studiati 44 pazienti (21maschi/23 femmine) sottoposti a resezione coloretale per neoplasia del colon retto, e 17 pazienti (controlli) (6 maschi/11 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 mio nuclei, localizzati all'interno della fibra muscolare e non nella loro fisiologica sede periferica e la presenza di fibre rigeneranti. La percentuale di fibre con nuclei interni è risultata significativamente più elevata nei pazienti (mediana= 9%, IQR=3.7-18.8) rispetto ai controlli (mediana= 2.7%, IQR= 1.7-3.2) ( $p=0.0002$ ). Nei pazienti abbiamo inoltre osservato una correlazione inversa tra la percentuale di fibre centronucleate e la presenza di metastasi linfonodali ( $(N+)(\rho)=-0.64$  ( $p=0.002$ )). I pazienti con neoplasia coloretale presentano una miopatia precoce caratterizzata da fibre centronucleate e segni di degenerazione/rigenerazione delle fibre muscolari. Tale miopatia sembra essere correlata ad uno stadio precoce di malattia e potrebbe essere identificata come una primaria risposta adattativa del tessuto muscolare scheletrico alla neoplasia, permettendo un suo impiego clinico come biomarcatore diagnostico precoce e prognostico di neoplasia.

### 1. INTRODUZIONE

#### 1.1 Il cancro del colon retto

#### 1.2 La cachessia neoplastica

- 1.3 Alterazioni del muscolo scheletrico
- 1.4 Cachessia nel cancro del colon retto
- 1.5 Il muscolo scheletrico
  - 1.5.1 Microscopia elettronica
  - 1.5.2 Istochimica ed enzimoistochimica
  - 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
- 1.6 Miopatie, miositi paraneoplastiche
- 1.7 Studi e modelli sperimentali di cachessia
- 2. OBIETTIVI DELLO STUDIO
- 3. MATERIALI E METODI
  - 3.1. Pazienti
  - 3.2. Biopsie muscolari
  - 3.3. Analisi morfologiche su sezioni criostatice seriali
    - 3.3.1 Analisi istologiche
    - 3.3.2 Analisi istochimiche
    - 3.3.3 Analisi immunoistochimiche
      - 3.3.3.1 Espressione di markers di rigenerazione
      - 3.3.3.2 Espressione di proteine associate al sarcolemma
      - 3.3.3.3 Distribuzione di cellule monolinfocitarie infiltranti
    - 3.4 Morfometria
    - 3.5. Dati operatori ed anatomopatologici
    - 3.6. Analisi statistica
  - 4. RISULTATI
  - 5. DISCUSSIONE
  - 6. CONCLUSIONI

### 1. INTRODUZIONE

Il cancro coloretale è uno delle neoplasie più frequenti nel mondo occidentale, con circa un milione di nuovi casi all'anno. Rappresenta la seconda causa di morte per cancro in Europa ed è la terza neoplasia più frequentemente diagnosticata negli USA. Circa il 50% dei pazienti affetti da neoplasia coloretale sviluppa una recidiva o ha un esito infausto entro 5 anni dalla diagnosi [1,2]. Una delle più gravi complicanze della malattia neoplastica, in particolare del tratto gastroenterico, è la cachessia neoplastica, che si manifesta in più dell'80% dei pazienti con neoplasia avanzata ed è un fattore dominante di morbilità e mortalità di questi pazienti [3]. 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 pre-clinici o basata su assunti biochimici noti; dibattuti rimangono i meccanismi che

## Subclinical myopathy in patients with colorectal cancer

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (1&2): 39-55

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 muscoloscheletrico va incontro nella fase precoce di sviluppo di una neoplasia.

### 1.1 Il cancro del colon retto

Nel mondo, ogni anno, più di 1 milione di individui svilupperà un cancro coloretale, con una mortalità specifica di circa il 33% nel mondo sviluppato [4]. La maggior parte delle neoplasie coloretali sono sporadiche. Fattori di rischio noti sono l'età, il sesso maschile, precedenti polipi o neoplasie del colonretto, oltre alla dieta (carne rossa, grassi, scarso apporto di fibre) e allo stile di vita (fumo, sedentarietà). 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). 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. La classica sequenza adenoma-carcinoma rimane ancora attuale, ma risulta sempre più appropriata una classificazione fenotipica basata su profili molecolari. La maggior parte dei cancri sporadici (circa l'85%) 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). I significati prognostici di questa classificazione non sono ancora ben chiari e di conseguenza anche il relativo trattamento clinico. La sopravvivenza per neoplasia coloretale è sostanzialmente aumentata negli anni, verosimilmente sia grazie alla precocità della diagnosi, sia al miglioramento dei trattamenti; la sopravvivenza a 5 anni risulta comunque ancora inferiore al 60% in molti paesi Europei. 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 [4]. I metodi sono numerosi e con limitazioni peculiari, così come per quanto riguarda i costi associati [4]. 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 [5]. 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 infatti alla sopravvivenza, indipendentemente dal trattamento. 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. 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. Altri marcatori promettenti risultano la presenza di instabilità dei microsatelliti, associata ad una miglior prognosi rispetto alle neoplasie con microsatelliti stabili; risulta essere associata ad una prognosi peggiore la presenza di una perdita dell'eterozigosi al cromosoma 18q; altri marcatori sono a tutt'oggi oggetto di studio, ma nessuno è stato ancora validato per la pratica clinica. 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 di ricerca da cui si spera di avere dati promettenti in questo senso [4].

### 1.2 La cachessia neoplastica

Nei pazienti in fase avanzata di malattia tumorale, la perdita severa di tessuto muscolare ed adiposo caratterizza la sindrome cachettica, fattore prognostico particolarmente sfavorevole e frequente causa di morte in questi soggetti [6]. Le alterazioni associate alla cachessia neoplastica sono l'anoressia, perdita di peso, perdita di massa muscolare ed atrofia muscolare, anemia, alterazione del metabolismo dei 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. A livello biochimico numerose e diverse sono le spiegazioni alla base della sindrome cachettica. La crescita della neoplasia è invariabilmente associata ad anoressia, con conseguente malnutrizione. La presenza del tumore determina alterazioni metaboliche, 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 [7]. Il sistema immunitario produce citochine che agiscono su numerose cellule bersaglio come i miociti, epatociti,

## Subclinical myopathy in patients with colorectal cancer

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (1&2): 39-55

adipociti, neuroni. Le citochine coinvolte sono il Tumornecrosisfactor alfa (TNF- $\alpha$ ), interleuchina-1 (IL-1), interleuchina-6 (IL-6) e interferone-gamma (IFN- $\gamma$ ). 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); 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. 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 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, le infiammazioni, ed è caratterizzata dalla sintesi di proteine plasmatiche da parte degli epatociti: Proteina C reattiva (PCR), l'Amiloide sierica A (SAA),  $\alpha$ 1-antitripsina, fibrinogeno, fattori del complemento e da una diminuzione dell'albumina e della transferrina.

Questo tipo di risposta è evidenziata in una buona parte dei pazienti con neoplasie associate ad importante calo ponderale. Le citochine infiammatorie, ed in particolar modo il TNF, determinano neurotossicità e neurodegenerazione [8]. 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 [9]. 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 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 venir 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 risulti da una alterata sintesi o da un' aumentata degradazione, o da cambiamenti in entrambi [7]. 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 vengono 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,

## Subclinical myopathy in patients with colorectal cancer

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (1&2): 39-55

bloccando la loro differenziazione, e quindi la rigenerazione delle fibre muscolari [7,10].

### 1.4 Cachessia nel cancro del colon retto

Il cancro del colon retto non è tipicamente dominato da un'alterata capacità di assunzione di cibo [11]. 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 [12]. 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 [12].

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 [3].

### 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 subsarcolemmali, dette cellule satelliti. Esse si attivano e diventano più numerose nei processi di ipertrofia e di rigenerazione muscolare, mentre diminuiscono in caso di inattività.

### 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 miofibrilla 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.

### Istochimica ed enzimoistochimica

Le reazioni istochimiche permettono di riconoscere nel sarcoplasma della fibra muscolare due sostanze biochimiche che costituiscono la sorgente energetica utilizzata dal muscolo per il proprio funzionamento: il glicogeno ed i lipidi. La colorazione all'acido periodico di Schiff (PAS) mostra una positività diffusa

## Subclinical myopathy in patients with colorectal cancer

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (1&2): 39-55

nel sarcoplasma delle fibre, legata alla presenza di glicogeno, una sostanza finemente granulosa distribuita lungo le miofibrille.

La colorazione con Oilred-orceina ed altre colorazioni specifiche evidenziano i lipidi neutri, sotto forma di materiale generalmente raccolto in vacuoli sarcoplasmatici. Entrambe le colorazioni appaiono più intense in alcune fibre rispetto ad altre, suggerendo proprietà biochimiche differenti nell'utilizzazione delle sorgenti energetiche tra le fibre di uno stesso fascicolo muscolare.

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 la evidenziazione della 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.

### 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. Nel loro insieme costituiscono, specie negli animali, i muscoli che macroscopicamente si presentano rossi, 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 contrazione lenta e da una elevata resistenza allo sforzo.

### Fibre di tipo II

Le fibre di tipo II sono caratterizzate da una contrazione veloce, assai più breve e potente rispetto alle fibre di tipo I. Esse hanno una scarsa resistenza allo sforzo. Queste fibre producono energia per via anaerobia per l'azione di enzimi quali la glicogeno fosforilasi. Realizzano contrazioni rapide e di breve durata. Reagiscono all'allenamento diventando ipertrofiche. Questo tipo di fibre si è dimostrato particolarmente suscettibile allo scarso utilizzo, andando incontro ad atrofia nell'invecchiamento, ma non necessariamente in seguito a denervazione [13].

### Plasticità del muscolo scheletrico

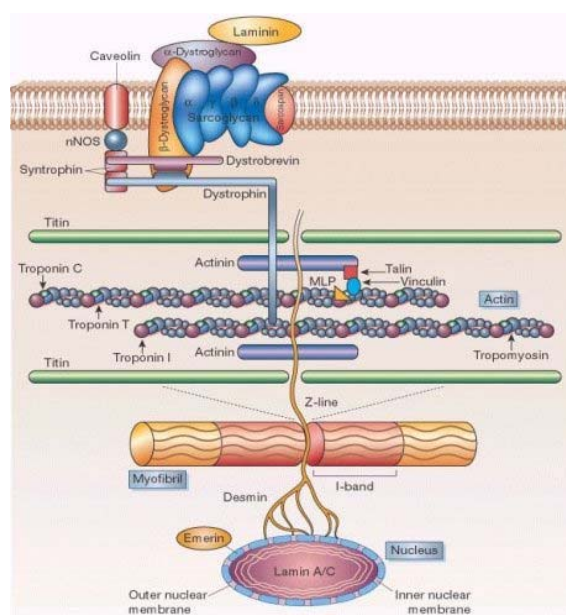
Una caratteristica essenziale del tessuto muscolare è la sua plasticità. Può infatti alterare le sue caratteristiche funzionali, morfologiche, metaboliche, subire una trasformazione di un tipo di fibra nel tipo opposto [13,14]. Questa situazione si realizza in alcune situazioni patologiche ed in seguito a stimoli esterni quali l'allenamento intensivo o la stimolazione elettrica funzionale. I muscoli sottoposti ad allenamento a sforzi progressivi e lunghi nel tempo si modificano nella loro tipologia attraverso una trasformazione delle fibre di tipo II esauribili e veloci, in fibre di tipo I a contrazione lenta e con alta 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 questi tipi di fibre. Ne consegue una ipertrofia muscolare con evidente predominanza tipologica di un tipo di fibra nei muscoli allenati [13]. La presenza di nuclei multipli in un comune citoplasma, pone il problema del loro controllo coordinato nelle fibre muscolari. Fino a poco tempo fa, poco era conosciuto sui meccanismi che regolano l'atrofia muscolare. Recenti studi hanno evidenziato come l'atrofia è correlata a una diminuzione dei mionuclei. Altrilavori 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 subcellulare, per esempio la placca neuromuscolare, sono capaci di esprimere alcuni geni inattivi nel resto dei mionuclei, così come avviene per esempio nelle giunzioni tendinee [14].

### Rigenerazione muscolare

## Subclinical myopathy in patients with colorectal cancer

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (1&2): 39-55

Il tessuto muscolare scheletrico è stabile, con modesto turnover dei nuclei, con una sostituzione settimanale 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 degenerativa e una rigenerativa. La degenerazione è caratterizzata dalla distruzione della membrana plasmatica e delle miofibre e dall'incremento sierico delle proteine muscolari come la creatinfosfochinasi (CPK), 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 poter 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 CPK 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 [15]. Nelle prime fasi dei processi degenerativi/rigenerativi vi è una attivazione delle cellule mononucleate infiammatorie. I neutrofilo sembrano essere presenti già nelle prime 1-6 ore dal danno; successivamente, dopo circa 48 ore, sopraggiungono 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 (ematocite o di cellule satellitiresidenti) 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 (embMHC). Nuclei centrali 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, i mio-nuclei si spostano alla periferia. In queste fasi vi è un'alterazione dell'espressione genica e si ha la



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

comparsa di alcune proteine intracellulari come le embMHC. Le cellule satelliti attivate hanno però la necessità di interagire con i numerosi fattori e stimoli presenti nel milieu extracellulare. A livello delle proteinetransmembrana 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 ed è espressa anche in miofibre denervate. Nella rigenerazione muscolare, la sua espressione è coincidente con i più precoci marcatori di differenziazione cellulare [16,17].

### 1.6 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

## Subclinical myopathy in patients with colorectal cancer

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (1&2): 39-55

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 [18].

### 1.7 Miopatie, miositi paraneoplastiche

In pazienti con sepsi o in stato critico spesso si evidenzia una sindrome caratterizzata da debolezza muscolare, in cui coesistono 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 [19,20]. Ben nota è l'associazione per esempio tra cancro e miopatie autoimmuni, come lapolimiosite 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 colo rettale [21]. Esistono poi evidenze sulla presenza anche di miositi paraneoplastiche, che presentano un tipico decorso strettamente correlato al trattamento della neoplasia di base [21,22]. 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 Centronucleata, che si presenta in 3 forme, una X-linked, una Autosomica Dominante e una Recessiva, con caratteristiche genetiche ed istologiche differenti [24,25]. Occasionalmente i mionuclei possono essere riscontrati in posizione centrale o centralizzata anche nelle biopsie considerate non

patologiche; si considera quindi normale fino ad un 5% di fibre con nuclei centrali e centralizzati [24]. 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 centronucleate 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 i geni coinvolti, come per esempio quello codificante per la miotubularina [24]. A livello biomorale l'aumento degli indici di flogosi (VES, PCR, alfa-2-globuline, etc.) e degli enzimi muscolari (CPK, LDH, Aldolasi) è un dato aspecifico che si riscontra in molte patologie, comprese le miopatie primarie e secondarie.

### 1.8 Studi e modelli sperimentali di cachessia

La sindrome cachettica sia nell'uomo sia in modelli sperimentali animali (ad esempio, neoplasia del colon retto nel topo [26,27] è preceduta dall'aumento in circolo di citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$ , IL-1, ed IL-6), proteine della fase acuta infiammatoria (proteina C reattiva) e dall'attivazione di pathways specifici, quale quello ubiquitina-proteosoma dipendente [28], che regolano la degradazione proteica. L'ubiquitina si può trovare libera o coniugata con legami isopeptidici ad altre proteine cellulari, e le proteine con numerose ubiquitine sono il bersaglio di una proteasi ATP-dipendente. L'infusione in ratti di TNF determina infatti un aumento della proteolisi con un aumento dell'espressione genica e di elevati livelli di ubiquitina libera e coniugata. Anche le altre citochine (IFN e IL-1) sembrano attivare l'espressione genica dell'ubiquitina [7,29].

Alcuni studi hanno evidenziato come nel muscolo scheletrico, durante la crescita tumorale, si verifichi un aumento del m-RNA delle UCP-2 e UCO-3, e che il TNF è capace di aumentare l'espressione genica di queste due proteine [30].

Gli studi sperimentali su modelli animali hanno quindi confermato un ruolo predominante delle citochine infiammatorie e delle proteine di fase acuta che nel loro insieme determinano uno stato infiammatorio cronico con un cambiamento del metabolismo proteico aumentando la sintesi di APR utilizzando gli aminoacidi derivati dalla degradazione muscolare [31]. In modelli murini di cachessia si è evidenziato come la presenza di una neoplasia intestinale determini uno stato infiammatorio cronico con perdita muscolare caratterizzata da diffusa degenerazione/rigenerazione



## Subclinical myopathy in patients with colorectal cancer

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (1&2): 39-55

muscolare, aumento di fibre con nuclei centralizzati, infiltrato infiammatorio ed espressione di embMHC.27 In topi cachettici si è evidenziato inoltre che l'atrofia muscolare è selettiva per le fibre di tipo II, in accordo con i dati ottenuti dall'analisi di biopsie muscolari di pazienti cachettici. Recenti studi su topi cachettici hanno sorprendentemente evidenziato che le membrane cellulari delle miofibre presentano morfologia irregolare, con alterazione dell'espressione e funzione del complesso della Distrofina, che in questi modelli è discontinua o addirittura assente in molte miofibre. Tale fenomeno sembra essere soprattutto a carico delle fibre di tipo II e sorprendentemente anche in biopsie muscolari in pazienti cachettici si evidenziano le stesse alterazioni [32].

### 2. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Lo scopo primario del seguente studio è di identificare la presenza nel muscolo scheletrico di pazienti con neoplasia del colon retto delle precoci alterazioni miopatiche cancro-correlate (delocalizzazione dei nuclei, segni di degenerazione/rigenerazione muscolare), con l'intento di individuare un nuovobiomarcatore diagnostico precoce di neoplasia. Questo studio si propone inoltre di evidenziare possibili correlazioni tra la miopatia, la sua caratterizzazione fenotipica e lo stadio della neoplasia al fine di individuare un possibile meccanismo patogenetico alla base della miopatia e/o un suo significato prognostico.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 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 Agosto 2010, tutti i pazienti candidati a resezione colica laparoscopica o laparotomica per neoplasia del colon retto sono stati arruolati nello studio. 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 infiammatoria è stato incluso nello studio come gruppo di controllo. Tutti i pazienti sono stati arruolati previo consenso informato scritto. Pre-operatoriamente sono stati registrati l'Indice di Massa Corporea (Body Mass Index; BMI), le caratteristiche demografiche, l'anamnesi medica, chirurgica e farmacologica; sono stati dosati i marcatori di neoplasia comunemente impiegati nella pratica clinica (CEA, Ca19.9,  $\alpha$ FP). I pazienti sono stati sottoposti a intervento chirurgico in anestesia generale o spinale con tecnica laparoscopica o laparotomica; al momento dell'induzione dell'anestesia è stato eseguito prelievo venoso per la determinazione sierica di marcatori di infiammazione (PCR) e di miopatia (CPK).

#### 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.

#### Analisi morfologiche su sezioni criostatiche seriali

Sezioni trasverse delle biopsie sono state allestite utilizzando un criostato alla temperatura di  $-22^{\circ}\text{C}$ . Le sezioni destinate all'analisi istologica e immunoistochimica (spessore di  $8\ \mu\text{m}$ ) sono state disposte su vetrini portaoggetti precedentemente trattati con polilisina. I vetrini sono stati conservati a  $-20^{\circ}$  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.

#### 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  $10\ \mu\text{m}$  sono state immerse per 15 minuti in Ematossilina di Mayer, lavate per un minuto in acqua distillata per eliminare l'eccesso di colorante, 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 descritto successivamente.

#### 3.2 Analisi istochimiche

L'attività ATPasica miofibrillare è evidenziata istochimicamente dopo preincubazione a pH basico o acido. Sezioni seriali da  $8\ \mu\text{m}$  sono state preincubate a temperatura ambiente per tre minuti in una soluzione di paraformaldeide al 5% in presenza di Na cacodilato 200 mM, CaCl<sub>2</sub> 268 mM, saccarosio 340 mM. Dopo lavaggio con una soluzione di Tris-HCl 0.1 M, CaCl<sub>2</sub> 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, CaCl<sub>2</sub> 18 mM a pH 7.8, le sezioni muscolari sono state incubate per 45 minuti a  $37^{\circ}\text{C}$  in una soluzione di 0.04 M di Na barbiturato, 18 mM di CaCl<sub>2</sub> e 2.76 mM ATP pH 9.4 (mezzo per ATP). 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. Sezioni seriali 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, CaCl<sub>2</sub> 18 mM a pH 7.8, incubate nel

## Subclinical myopathy in patients with colorectal cancer

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (1&2): 39-55

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 CoCl<sub>2</sub>, si forma così fosfato di cobalto. Segue la reazione con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S e la formazione di solfuro di cobalto che dà un precipitato nero. 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.

### **Analisi immunoistochimiche**

Le sezioni criostatiche (spessore 8 µm) sono state incubate in siero di capra al 10 % a temperatura ambiente per 30 minuti per dimostrare la presenza di fibre rigeneranti esprimenti la isoforma embrionale della miosina e la molecola di adesione cellulare neuronale, la presenza di cellule monolinfocitarie infiltranti esprimenti l'antigene leucocitario comune e l'espressione delle proteine associate al sarcolemma laminina e distrofina.

### **Espressione di markers 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 due volte (10 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), controcolorati con Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), per marcare i nuclei, lavati ulteriormente con acqua, montati con il montante DakoFluorescentMounting 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 mm<sup>2</sup> dell'area totale della biopsia (un mm<sup>2</sup> corrisponde a circa 500 fibre).

### **Espressione di proteine associate al 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

**Tabella I.** Caratteristiche demografiche dei pazienti; sede e stadiazione post operatoria delle neoplasie

	<b>Pazienti</b> (numero; %)
<b>Età</b> Mediana(IQR)	66.5 (60.5-70)
<b>Sesso:</b> M:F	21:23
<b>Sede neoplasia</b>	
Colon destro	8 (18)
Colonsinistro	23 (52)
Retto	12 (27)
Colon-retto	1 (3)
<b>Stadio neoplasia</b>	
pTis/T1/T2	20 (45)
pT3/T4	24 (55)
pN0	31 (70)
pN1-2	13 (30)
pM0	41 (93)
pM1	3 (7)

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

## Subclinical myopathy in patients with colorectal cancer

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (1&2): 39-55

**Tabella II.** Caratteristiche istopatologiche riscontrate nelle biopsie muscolari dei pazienti e dei controlli.

	<b>Pazienti 44</b>	<b>Controlli 17</b>	<b>p-value</b>
<b>Fibre centro nucleate (%)</b>	9 (3.7-18.8)	2.7 (1.7-3.2)	0.0002
<b>Diametro fibre(µm)</b>	51.1 (46.9-58.9)	50.3 (44.2-52.9)	N.S.
<b>Fibre tipo II (%)</b>	55.5 (45.5-66)	46 (40-62)	0.06
<b>Fibre esprimenti embMHC(%)</b>	6 (14.6)	1 (5.9)	N.S
<b>Fibre esprimenti NCAM (%)</b>	13 (31.7)	1 (5.9)	0.04

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

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 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 DakoFluorescentMounting Medium ed osservati al microscopio a fluorescenza (Zeiss).

### **Distribuzione di cellule monolinfocitarie infiltranti**

Sezioni seriali sono state incubate con anticorpi monoclonali murinidiretti contro l'antigene leucocitario comune CD45 (Dako, diluito 35 mg/ml in soluzione salina tamponata con fosfato, contenente albumina di sierobovino) per tutta la notte in camera umida. Dopo tre lavaggi in PBS, le sezioni sono state incubate con l'anticorpo secondario anti-mouse IgGbiotinilato (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 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.

### **Morfometria**

Le immagini dei preparati istologici, colorati con ematossilina-eosina od utilizzati per le analisi immunoistochimiche, 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, ed i calcoli matematici eseguiti con Excel (Microsoft office 2000 professional). Sulle immagini ottenute sono stati calcolati i diametri minimi medi delle miofibre, contate le fibre rigeneranti esprimenti MHCemb e NCAM e le fibre con distribuzione anomala dei mio nuclei, localizzati all'interno o all'esterno rispetto al sarcolemma. Il numero delle fibre con nuclei interni è stato espresso in percentuale rispetto al numero di miofibre per biopsia. 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](http://www.scioncorp.com), derivato da quello messo a punto dal National Institutes of Health di Bethesda, Maryland.

### **Dati operatori ed anatomopatologici**

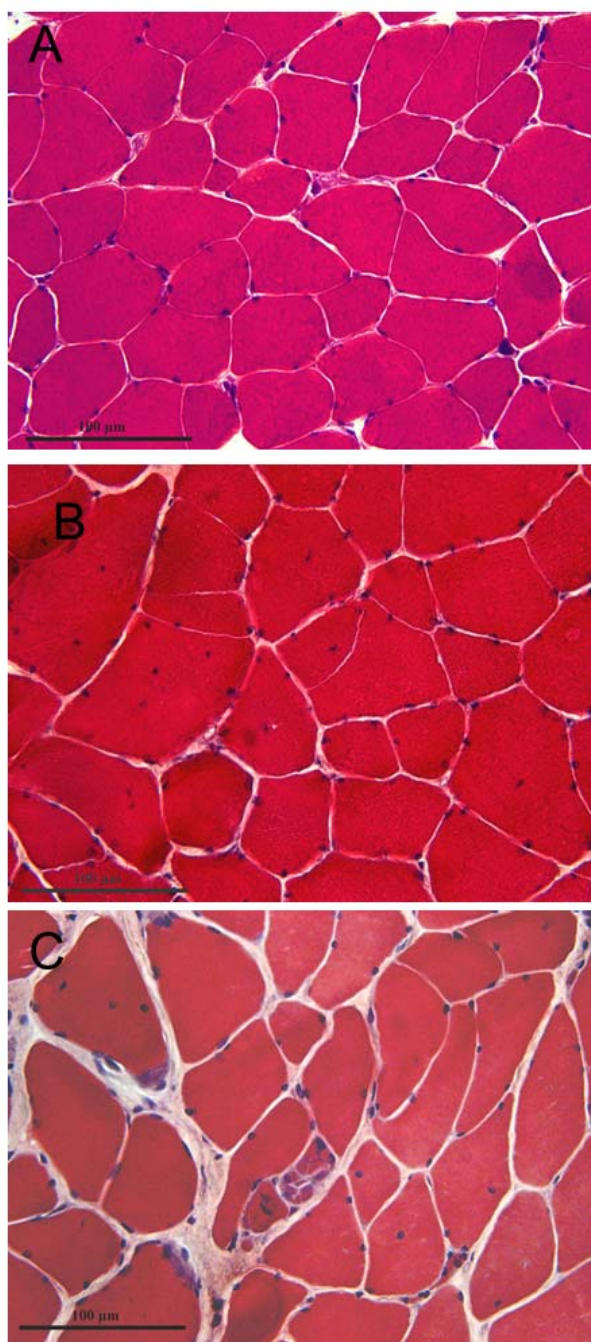
Di tutti i pazienti sono stati registrati e inseriti in un data base il tempo operatorio, il tipo di tecnica chirurgica ed anestesologica usata, la sede della neoplasia e la successiva caratterizzazione fenotipica della neoplasia asportata. I pazienti sono stati seguiti con follow-up ambulatoriale e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

### **Analisi statistica**

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

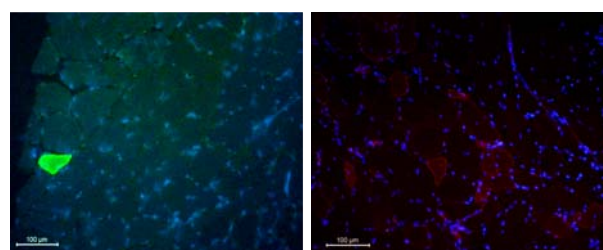
## Subclinical myopathy in patients with colorectal cancer

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (1&2): 39-55



**Fig 2** Aspetti istologici del retto dell'addome normale e di pazienti affetti da neoplasia del colon retto. Ematossilina ed Eosina. Barra di calibrazione 100 µm. A, muscolo normale; B e C, muscolo di pazienti affetti da neoplasia. Nei pazienti il muscolo presenta numerose fibre con distribuzione anomala dei mio nuclei, ed aspetti di degenerazione e rigenerazione delle fibre muscolari.

Fisher. L'associazione tra due variabili numeriche continue è stata valutata con il coefficiente Rho di Spearman. È stato considerato significativo un valore



**Fig 3** Caratterizzazione immunoistochimica della isoforma embrionale della miosina (MHCemb) e della molecola di adesione cellulare neuronale (NCAM) nel retto dell'addome di pazienti con neoplasia colo-rettale. Barra di calibrazione 100 µm. Sinistra, fibre esprimenti embMHC (verdi); Destra, fibre esprimenti NCAM (rosse).

della  $p$  inferiore a 0.05. L'analisi statistica è stata eseguita con il programma statistico SAS 9.1 e il linguaggio R 2.5.

### 4. RISULTATI

Presso l'Unità di Chirurgia Coloproctologica della Clinica Chirurgica I dell'Università degli Studi di Padova, da Luglio 2008 ad Agosto 2010, 44 pazienti (21maschi/23 femmine), di età mediana di 66,5 anni (Intervallo InterQuartile (IQR): 60,5-70 anni), sottoposti a resezione coloretale per neoplasia del colon retto, sono stati sottoposti a biopsia del muscolo retto dell'addome.

Nello stesso periodo 17 pazienti (controlli) (6 maschi/11 femmine) ( $p=N.S.$ ) sottoposti a interventi chirurgici per patologie benigne non infiammatorie (2 laparoscopie esplorative, 4 colecistectomie, 1 colectomia per stipsi cronica e 10 ernioplastiche inguinali) sono stati sottoposti alla medesima biopsia. L'età mediana dei controlli era di 45 anni (IQR: 28-62 anni) ( $p=0.005$ ). In tabella I sono evidenziate le caratteristiche demografiche dei pazienti e la sede e la stadiazione post operatoria della neoplasia. Tutti i pazienti e i controlli erano asintomatici per mialgie, astenia e debolezza muscolare. 21 pazienti (52%) erano stati già sottoposti a precedenti interventi chirurgici addominali; dall'anamnesi farmacologica risultava che il 20% assumeva farmaci potenzialmente miopatici (ad esempio: statine, ipoglicemizzanti). Sono state seguite 24 (55%) resezioni del colon retto per via laparoscopica e 20 (45%) per via laparotomica; la durata mediana dell'intervento è stata di 135 minuti (IQR:120-150 minuti). Nel gruppo dei pazienti abbiamo osservato un numero significativamente elevato di fibre con nuclei interni rispetto ai controlli, senza identificare atrofia cellulare (Tabella II e Figura 2).

In particolare il 59% dei pazienti presentava una percentuale patologica (maggiore del 5%) di fibre con nuclei interni. Nei pazienti sono state individuate un maggior numero di fibre rigeneranti esprimenti

### Subclinical myopathy in patients with colorectal cancer

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (1&2): 39-55

**Tabella III.** Correlazione tra percentuale di fibre centro nucleate e caratteristiche cliniche e fenotipiche della neoplasia.

	Fibre centro nucleate (%)	p-value
Età dei pazienti ( $\rho$ )	Mediana (IQR) -0.09	N.S.
<b>Sesso</b>		
M	9 (3-18)	N.S.
F	10.5 (4.5-19.1)	
<b>BMI</b> ( $\rho$ )	0.27	N.S.
<b>pT</b>		
1-2	7 (3.3-19)	N.S.
3-4	8 (3.7-11.9)	
<b>pN</b>		
0	12.7 (4.5-20)	0.005
1-2	4 (3-7.7)	
<b>N+</b> ( $\rho$ )	-0.64	0.002
<b>pM</b>		
0	9.8 (3.7-19)	N.S.
1	4(3.1-5.3)	
<b>Invasione vascolare</b>		
Assente	9 (4.3-20)	0.07
Presente	4.4 (3-11)	

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

MHCemb (14,6 %) e NCAM (31,7 %) rispetto ai controlli (Tabella II e Figura 3). All'analisi multivariata, al netto dell'effetto dell'età, si è confermata la significatività per la maggior percentuale di fibre con nuclei interni nei pazienti rispetto ai controlli ( $p=0,002$ ), mentre non è significativa la differenza nell'espressione del marcatore di miogenesi NCAM. L'analisi istochimica dell'attività ATPasica ha evidenziato che le fibre centronucleate sono prevalentemente di tipo rapido; si è inoltre osservata l'assenza di infiltranti monocellulari positivi per l'antigene leucocitario comune CD45. Qualche rara cellula CD45 positiva è stata identificata all'interno di piccoli vasi e nella matrice extracellulare (Figure 4 e 5). L'analisi immunohistochimica per le proteine associate al sarcolemma ha rilevato che nei soggetti affetti da neoplasia, l'espressione 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 6). Nel gruppo dei pazienti l'aumentato numero di fibre con nuclei interni non è correlato al tipo di intervento, di anestesia, né all'assunzione di farmaci miopatici o precedenti interventi chirurgici addominali, né alla sede della neoplasia, né ai comuni marcatori di neoplasia impiegati nella pratica clinica (CEA).

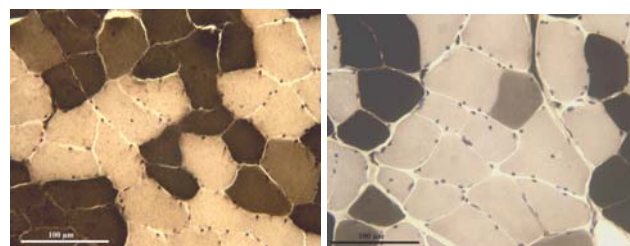
Nei pazienti con neoplasia metastatizzata ai linfonodi abbiamo evidenziato un numero di fibre con localizzazione anomala dei mionuclei significativamente minore rispetto a quelli esenti da metastasi linfonodali ( $p=0,005$ ), con una correlazione inversa allo stato linfonodale ( $p=0,002$ ) (Tabella III).

I dosaggi sierici della PCR e della CPK sono lievemente aumentati solo in alcuni pazienti senza

alcuna correlazione con la presenza di fibre muscolari con nuclei internalizzati o espressione di marcatori di rigenerazione.

#### 5. DISCUSSIONE

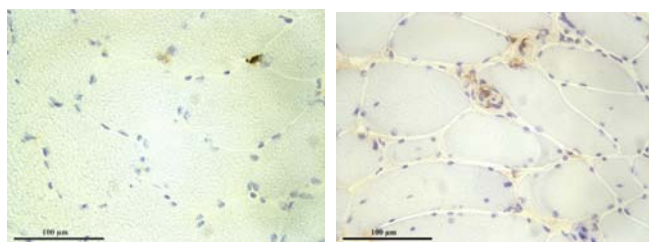
Il cancro colo rettale rappresenta la seconda causa di morte per cancro in Europa ed è la terza neoplasia più frequentemente diagnosticata negli USA. Una delle più temibili complicanze delle neoplasie, che fatalmente conduce a morte, è la cachessia neoplastica, che si sviluppa negli stadi terminali ed è caratterizzata da una importante perdita di massa muscolare con conseguente astenia e debolezza [1-3,6]. Ben note sono le alterazioni cui il muscolo scheletrico va incontro negli stadi avanzati della malattia neoplastica, così come dopo chemioterapia e radioterapia; altrettanto



**Fig 4** Analisi istochimica di retto dell'addome normale e di pazienti affetti da neoplasia del colon retto. Barra di calibrazione 100  $\mu$ m. ATPasimiosinica pH 4,35 rispettivamente di muscolo normale (a sinistra) e di muscolo di paziente con neoplasia (a destra). Nei pazienti, le fibre con distribuzione anomala dei mionuclei sono preferenzialmente di tipo rapido (bianche).

## Subclinical myopathy in patients with colorectal cancer

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (1&2): 39-55



**Fig 5** *Analisi istochimica di infiltrati monolinfocitari esprimenti l'antigene CD45. A sinistra, muscolo normale; A destra muscolo di pazienti con neoplasia. Non sono presenti cellule monolinfocitarie (marroni). Qualche rara cellula CD45 positiva è stata identificata all'interno di piccoli vasi e nella matrice extracellulare.*

conosciuta è l'associazione tra le neoplasie e le sindromi autoimmuni come le miositi e le dermatomiositi [21,22]. In un 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 [33].

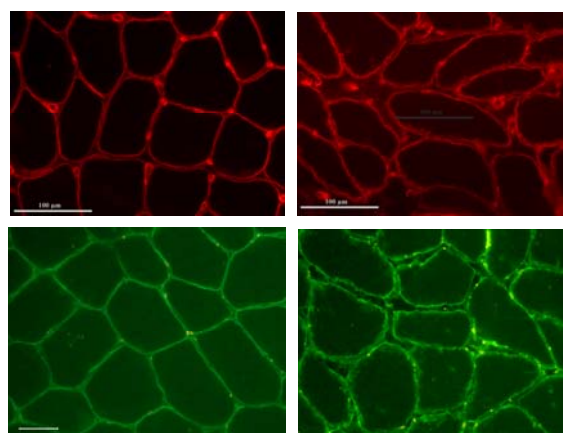
Allo scopo di verificare se i pazienti affetti da neoplasia del colon retto, normopesi e asintomatici per astenia e debolezza muscolare, presentino già a stadi precoci di malattia delle alterazioni del tessuto muscolare, abbiamo eseguito biopsie del muscolo retto dell'addome nei pazienti che dovevano essere sottoposti a resezione laparoscopica del colon retto. Con le analisi istologiche, istochimiche e immunoistochimiche 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 mionuclei, delocalizzati rispetto alla normale sede sub-sarcolemmale verso il centro della fibra (miofibre centronucleate), e fibre rigeneranti esprimenti o l'isoforma embrionale della catena pesante della miosina (MHCemb), o la molecola di adesione neuronale (NCAM), due classici marcatori di miogenesi rigenerativa muscolare. In particolare circa il 60% dei pazienti presentava una percentuale di fibre centronucleate patologica, maggiore cioè del 5% delle fibre [24].

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, non solo 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 mionuclei. Nelle malattie genetiche centro nucleate sembra sia un'alterata maturazione delle miocellule o, in altri casi, una risposta a un danno neurologico [24,25]. Anche in modelli animali di cachessia neoplastica si evidenziano fibre muscolari centronucleate, ma esse sono prevalentemente delle piccole fibre muscolari rigeneranti con la presenza di un significativo infiltrato infiammatorio nella matrice extracellulare [27].

Nel nostro studio non abbiamo evidenziato correlazione tra fibre presentanti una distribuzione anomala dei mionuclei con l'età dei pazienti; tale reperto, infatti, non è generalmente riscontrato con tale frequenza nei soggetti anziani, essendo associato a malattie genetiche, metaboliche o neurologiche [34].

L'analisi istochimica dell'attività ATPasica ha inoltre evidenziato che le fibre con nucleo centralizzato sono prevalentemente di tipo rapido, suggerendo che la ridistribuzione dei nuclei all'interno delle miofibre non sia né focale né casuale ma ristretta a 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 [32]. Tale osservazione crea un interessante nesso tra le



**Fig 6** *Caratterizzazione immunoistochimica della laminina e della distrofina nel muscolo normale e nel retto dell'addome dei pazienti affetti da neoplasia colonrettale. Barra di calibrazione 100 µm. A-C, muscolo normale; B-C retto dell'addome di pazienti con neoplasia. Nei soggetti affetti da neoplasia, l'espressione delle proteine associate al sarcolemma laminina (B) e distrofina (D) è tortuosa e discontinua, rispetto a quanto si osserva nel muscolo normale (A, C rispettivamente).*

## Subclinical myopathy in patients with colorectal cancer

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (1&2): 39-55

alterazioni miopatiche da noi riscontrate e gli stadi avanzati di cachessia neoplastica. A differenza della cachessia manifesta però nei nostri pazienti non abbiamo evidenziato un significativo infiltrato infiammatorio né atrofia delle fibre muscolari. I comuni marcatori di flogosi e di danno muscolare (PCR e CPK) sono sostanzialmente nella norma, confermando che il danno muscolare è veramente precoce, non sufficiente a creare necrosi dei miociti, e che lo stato infiammatorio cronico tipico della sindrome cachettica non può qui essere considerato come elemento decisivo.

Il riscontro di fibre rigeneranti esprimenti MHCemb e NCAM è un elemento tipico di uno stato di degenerazione/rigenerazione muscolare che è iniziato già da qualche tempo, sicuramente precedente al prelievo biotico a cielo aperto; questo suggerisce che il danno muscolare e la miopatia da noi osservata non siano quindi legati né alle modalità del prelievo biotico effettuato durante l'intervento chirurgico, né all'attivazione di processi pro-infiammatori quali quelli osservati nei modelli murini di sindrome cachettica da neoplasia del colon-retto [27].

Non è stata riscontrata alcuna correlazione con la sede della neoplasia, né con l'assunzione di farmaci miopatici, né con le comuni caratteristiche fenotipiche studiate, suggerendo che è la presenza della neoplasia stessa a indurre la miopatia, più che le sue caratteristiche.

Inaspettatamente abbiamo riscontrato una correlazione inversa tra il numero di fibre centronucleate e la presenza di metastasi linfonodale nei pazienti. 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 correlate a uno stadio molto precoce di malattia.

L'assenza di fibre atrofiche, di neovascolarizzazione e di un manifesto stato infiammatorio supporta tale osservazione, che ci fa ipotizzare quindi che alla base ci sia un meccanismo adattativo delle miofibre alla 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.

Il legame tra la miopatia da noi rilevata e la cachessia sembra, però, essere rafforzato dal riscontro di alterazioni delle proteine del sarcolemma, nello specifico laminina e distrofina. All'analisi immunostochimica abbiamo, infatti, osservato che in alcune biopsie, soprattutto in quelle di pazienti con una percentuale maggiore di fibre centronucleate, l'espressione delle due proteine è tortuosa e discontinua, rispetto ai controlli sani, e con caratteristiche simili a quelle descritte in biopsie eseguite su modelli murini sperimentali di cachessia e in pazienti cachettici [32].

A oggi i migliori risultati ottenuti nella cura del cancro coloretale sono stati raggiunti grazie alla possibilità di ottenere una diagnosi sempre più precoce, in prima istanza con i programmi di screening; è quindi molto attuale la ricerca di nuovi 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 essere 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". Attualmente i programmi di screening portano all'attenzione del chirurgo pazienti con neoplasie a stadi sempre più precoci, imponendo un trattamento personalizzato, con attenta valutazione dei rischi e benefici correlati all'atto chirurgico e 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 è 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 nuovo marcatore predittivo di 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 le quali gli attuali mezzi diagnostici e di screening sono problematici.

### 6. CONCLUSIONI

Queste osservazioni nel loro insieme indicano che i pazienti affetti da neoplasia del colon retto presentano una miopatia subclinica caratterizzata dal punto di vista istologico da fibre centro nucleate e miofibre rigeneranti e che tale miopatia presenta una correlazione inversa alla presenza di metastasi linfonodale nella neoplasia asportata.

I fattori e il meccanismo patogenetico associati a questa miopatia non sono ancora noti e uno studio più dettagliato sul potenziale meccanismo molecolare responsabile dello sviluppo di una miopatia cancro-correlata potrebbe portare all'identificazione di biomarcatori circolanti con un caratteristico profilo che corrisponde all'istopatologia del tessuto muscolare, rappresentando una sorta di "biopsia biochimica", che potrebbe essere utile nei programmi di screening al

## Subclinical myopathy in patients with colorectal cancer

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (1&2): 39-55

fine di raggiungere una diagnosi precoce con un metodo non invasivo.

### Corresponding Author

Massimo Vecchiato, MD, Department of Oncological and Gastroenterological Surgical Sciences (Discog); University of Padova, Via Giustiniani 2, I-35100 Padova, Italy.

E-mail: massimo.vecchiato@gmail.com

### References

- [1] Gellad ZF, Provenzale D. Colorectal cancer: national and international perspective on the burden of disease and public health impact. *Gastroenterology* 2010; 138: 2177-2190.
- [2] Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW. Colorectal cancer. *Lancet* 2005; 365: 153-165.
- [3] 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.
- [4] Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, Starling N. Colorectal cancer. *Lancet* 2010; 375: 1030-1047.
- [5] Bujanda L, Cosme A, Gil I, Arenas-Mirave JJ. Malignant colorectal polyps. *World J Gastroenterol* 2010; 16(25): 3103-3111.
- [6] Tisdale MJ. Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2002; 62: 2771-77.
- [7] 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.
- [8] Turrin NP, Plata-Salaman CR. Cytokine-cytokine interactions and the brain. *Brain Res Bull* 2000; 51: 3-9.
- [9] Coma M, Vincente R, Busquets S, Carbò N, Tamkun MM, Lopez-Soriano FJ. *FEBS Lett*. 2003; 536: 45-50.
- [10] Costelli P, Muscaritoli M, Bossola M, Moore-Carrasco R, Crepaldi S, Grieco G, Autelli R, Bonelli G, Pacelli F, Lopez-Soriano FJ, Argilés JM, Doglietto GB, Baccino FM, Rossi Fanelli F. Skeletal muscle wasting in tumor-bearing rats is associated with MyoD down-regulation. *Int J Oncol* 2005; 26(6): 1663-8.
- [11] Brookes G. Nutritional status in head and neck cancer: observation and implication. *Clin Otolaryngology Allied Sciences* 1982; 8: 211-220.
- [12] Ravasco P, Monteiro I, Camilo M. *Cancer Investigation*. 2007; 25: 308-314
- [13] Scelsi R. Morfologia del muscolo scheletrico normale e patologia muscolare nella paraplegia da lesione del primo motoneurone. *Basic Appl Myol* 2007; 1: 8-18.
- [14] Allen DL, Roy RR, Edgerton VR. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve* 1999; 22: 1350-1360.
- [15] 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: 115-28.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] Coakley JH, Nagendran K, Yarwood GD, Honavar M, Hinds CJ. Patterns of neurophysiological abnormality in prolonged critical illness. *Intensive Care Med*. 1998; 24(8): 801-80.
- [20] 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.
- [21] Hill CL, Zhang Y, Sigurgeirsson B, Pukkala E, Mellekjaer L, Airio A, Evans SR. Frequency of specific cancer types in dermatomyositis and polymyositis: a population based study. *Lancet* 2001; 357: 96-100.
- [22] Raccanelli V, Prete M, Minoia C, Favoino E, Perosa F. Rheumatic disorders as paraneoplastic syndromes. *Autoimmunity Rev* 2008; 7: 352-358.
- [23] Kehler T, Curkovic B. Polymyalgia rheumatic and colon malignancy: case report. *Clin Rheumatol* 2006; 25: 764-765.
- [24] Pierson CR, Tomczak K, Agrawal P, Moghadaszadeh B, Beggs AH. X-linked myotubular and centronuclear myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64: 555-564.
- [25] Romero NB. Centronuclear myopathies: a widening concept. *Neuromuscul Disord* 2010; 20: 223-228.



### Subclinical myopathy in patients with colorectal cancer

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2012; 22 (1&2): 39-55

- [26] Coletti D, Belli L, Adamo S. Cachexia: novel perspectives for and old syndrome. *Basic Appl Myol* 2006; 16: 131-139.
- [27] 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.
- [28] Breen HB, Espat NJ. The ubiquitin-proteasome proteolysis pathway: potential target for disease intervention. *J Parenter Enteral Nutr* 2004; 28: 272-277.
- [29] Garcia-Martinez C, Llovera M, Agell N, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Ubiquitin gene expression in skeletal muscle is increased by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 201: 682-686.
- [30] Busquets S, Sanchis D, Alvarez B, Ricquier D, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. In the rat, TNF- $\alpha$  administration results in an increase in both UCP2 and UCP3 mRNA in skeletal muscle: a possible mechanism for cytokine-induced thermogenesis? *FEBS Lett* 1998; 440: 348-350.
- [31] Moresi V, Pristerà A, Scicchitano BM, Molinaro M, Teodori L, Sassoon D, Adamo S, Coletti D. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibition of skeletal muscle regeneration is mediated by a caspase-dependent stem cell response. *Stem Cell* 2008; 26: 997-1008.
- [32] Acharyya S, Butchbach ME, Sahenk Z, Wang H, Saji M, Carathers M, Ringel MD, Skipworth RJ, Fearon KC, Hollingsworth MA, Muscarella P, Burghes AH, Rafael-Fortney JA, Guttridge DC. Dystrophin glycoprotein complex dysfunction: a regulatory link between muscular dystrophy and cancer cachexia. *Cancer Cell* 2005; 8: 421-432.
- [33] 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.
- [34] Faulkner JA, Larkin LM, Claflin DR, Brooks SV. Age-related changes in the structure and function of skeletal muscles. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 1091-1096.