

## INDICE

	<i>Pag.</i>
<b>Introduzione</b>	<b>2</b>
<b>Materiali e metodi</b>	<b>6</b>
<b>Risultati</b>	<b>10</b>
<b>Discussione</b>	<b>18</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>23</b>

## INTRODUZIONE

Le malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI) rientrano tra le più importanti affezioni del tratto gastrointestinale. Possono essere suddivise in due forme principali, la Colite Ulcerosa (CU) e la Malattia di Crohn (MC) e sono caratterizzate da un processo infiammatorio della mucosa colica e della parete intestinale, indotto da una cronica attivazione del sistema immunitario che porta ad una risposta infiammatoria persistente, differente dalle infiammazioni intestinali comuni in cui la risposta infiammatoria cessa nel momento in cui l'agente scatenante viene rimosso.

Nella Malattia di Crohn il processo infiammatorio può colpire qualsiasi parte dell'intestino, con maggior frequenza l'ileo terminale e il colon. L'infiammazione, spesso caratterizzata dalla presenza di granulomi, coinvolge l'intero spessore della parete intestinale, portando a stenosi e fistole. Tale patologia è solitamente segmentaria, con aree interessate da infiammazione, separate da mucosa macroscopicamente normale. Al contrario, la colite ulcerosa interessa sempre il retto e l'infiammazione si estende cranialmente in modo continuo fino al cieco. Sono interessati dalla malattia solo la mucosa e la sottomucosa e l'infiammazione è tipicamente non-granulomatosa (1).

Negli ultimi trent'anni è stata osservata una considerevole variazione nell'epidemiologia delle MICI, con il riscontro di una maggiore prevalenza nei paesi industrializzati ed un alto tasso di incidenza in Nord America ed Europa (2).

Alla base della patogenesi delle MICI sembra esserci un'anomala risposta immunitaria cellulo-mediata influenzata dal microbiota intestinale in soggetti geneticamente suscettibili (3).

L'eziologia di tali patologie rimane tuttora sconosciuta nonostante numerosi studi abbiano migliorato la comprensione dei processi multifattoriali quali l'influenza di fattori genetici, ambientali e microbici (4).

Le malattie infiammatorie croniche intestinali rappresentano un fattore di rischio per lo sviluppo del cancro del colon-retto, con una prevalenza del 2-3% a 10 anni dalla diagnosi di malattia (5).

Nel XIX secolo, Rudolph Virchow aveva già ipotizzato un legame tra infiammazione cronica e cancro. L'infiammazione cronica è, infatti, una fonte di insulto per l'organismo mediante l'infiltrazione nei tessuti da parte dei macrofagi e il loro rilascio di radicali liberi, specie azotate, citochine e fattori di crescita (6-7). Questo meccanismo può indurre diverse conseguenze, quali influenzare la crescita cellulare, la differenziazione e l'apoptosi, danno al DNA e promuovere l'angiogenesi (8-9).

In realtà, l'incidenza del cancro del colon-retto nelle MICI è aumentata sia nella colite ulcerosa sia nella malattia di Crohn, che si distinguono come importanti fattori di rischio, assieme a poliposi adenomatosa familiare e il cancro del colon-retto ereditario non-poliposico (10).

Tuttavia, vi è una complessa interazione tra infiammazione e cancro. Le cellule tumorali possono produrre diverse citochine le quali inducono il reclutamento di cellule infiammatorie (macrofagi, linfociti e altri) in grado, a loro volta, di produrre altre citochine e di alterare il microambiente tumorale (11).

Un'infiammazione persistente, caratteristica delle MICI, causa anche sovrapproduzione di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto, che possono indurre un danno al DNA (12), ripetuti danni ai tessuti bersaglio e influenzando negativamente i processi di riparazione.

Studi in letteratura mostrano che mutazioni puntiformi di p53, oncosoppressore e fattore di trascrizione che regola il ciclo cellulare, presentano una simile incidenza sia nei tumori che in condizioni di infiammazione cronica, come ad esempio l'artrite reumatoide. Mutazioni a carico di p53 e dell'attività iNOS risultano aumentati nella mucosa del colon di pazienti affetti da colite ulcerosa, rimarcando il legame tra infiammazione cronica e danni genetici (13).

Un fattore chiave nella riparazione del danno epiteliale e dell'inflammatione è l'NF-kB, fattore di trascrizione attivato da una varietà di stimoli proinflammatori.

L'NF-kB attivato è stato rilevato in diversi tipi di tumori solidi (14), in cui è stato dimostrato che può contribuire alla carcinogenesi mediante l'attivazione di geni coinvolti nella sopravvivenza cellulare e nel blocco dell'apoptosi (15-16). Come fattore importante della risposta infiammatoria, l'NF-kB è stato rilevato sia nelle cellule epiteliali che nei macrofagi a livello della mucosa intestinale di pazienti affetti da MICI (17), sia in campioni di cancro coloretale (18). La sua attivazione nella carcinogenesi coloretale sembra essere precoce: l'inattivazione del gene Adenomatous Polyposis Coli (APC), uno dei primi step in questo processo (19), può indurre la degradazione proteosomica dell'IkB, inibitore a cui è legato l'NF-KB in forma inattivata, producendo così NF-kB (20). Una prova indiretta del coinvolgimento di questa via nello sviluppo di cancro del colon-retto associato ad infiammazione cronica, deriva anche dalla dimostrazione che l'utilizzo di farmaci anti-inflammatori non-steroidi, efficaci nel ridurre il rischio di cancro del colon-retto (21-22), inibisce il segnale dell'NF-kB IKK $\beta$ -dipendente (23-25).

L'attivazione dell'NF-kB potrebbe quindi giocare un ruolo chiave tra i meccanismi infiammatori e la carcinogenesi nelle MICI.

Uno dei fattori tumorali NF-kB-dipendente è l'Interleuchina-6 (IL-6), citochina che gioca un ruolo fondamentale nella sopravvivenza cellulare, nella proliferazione e nell'apoptosi (26).

Dati in letteratura dimostrano il suo ruolo patogenetico centrale nella differenziazione e sopravvivenza dei patogeni ed in particolare nelle MICI dove promuove il mantenimento di uno stato infiammatorio cronico, mediante la produzione costante di citochine e fattori di crescita (27-28). E' stato inoltre dimostrato che l'IL-6 può agire come pro-oncogeno, aumentando la proliferazione cellulare nel cancro del colon (29-32).

L'Interleuchina-6 e il fattore di crescita stimolante le colonie macrofagiche (CSF-1), prodotti dalle cellule neoplastiche, possono richiamare precursori mieloidi e indurre un fenotipo di tipo macrofagico; inoltre, le cellule dendritiche ricreate dai tumori sono spesso difettose e incapaci di stimolare le cellule T (33). I macrofagi presenti nel tessuto tumorale possono produrre diverse citochine e fattori di crescita, stimolando l'angiogenesi, e quindi favorendo nella progressione della malattia (34). In particolare, producono Interleuchina-10 (IL-10), citochina che inibisce la risposta immunitaria, ma possono anche sopprimere le cellule neoplastiche mediante produzione di Interleuchina-2 (IL-2), Interleuchina-12 (IL-12) e Interferone-  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) (35-36).

E' stato dimostrato che l'IL-6 gioca un ruolo fondamentale nella tumorigenesi mediante l'attivazione del pathway del Segnale di Trasduzione ed Attivazione della Trascrizione 3 (STAT3), il quale regola la sopravvivenza cellulare e la progressione del ciclo cellulare. L'attivazione di questa via sembra essere un passaggio necessario per l'induzione sperimentale del cancro del colon e del fegato (37-39). L'importanza dell'IL-6 nella tumorigenesi è anche confermata dai suoi livelli plasmatici aumentati nell'obesità e nel diabete mellito di tipo II (40-41), due condizioni patologiche associate a un aumentato rischio di sviluppo di cancro (42-43). Aumentati valori plasmatici di IL-6 sono inoltre considerati uno dei maggiori fattori di rischio nello sviluppo di cancro del colon (44) e dell'epatocarcinoma nell'uomo (45).

Il cancro del colon nelle MICI rappresenta, pertanto, un esempio peculiare della correlazione tra infiammazione cronica e tumorigenesi.

In questo studio abbiamo valutato l'esistenza e il tipo di alterazioni morfologiche, precancerotiche peculiari, nelle cellule epiteliali della mucosa colica di pazienti affetti da CU.

## **MATERIALI E METODI**

### **Popolazione**

Per questo studio sono stati utilizzati campioni biotici di mucosa colica di 10 pazienti (5 maschi, età media  $45.8 \pm 10.3$  anni), di cui 5 affetti da colite ulcerosa (CU) e 5 soggetti sani (3 maschi, età media  $56 \pm 9.6$  anni).

Dopo aver firmato il consenso informato, i pazienti sono stati sottoposti a colonscopia, effettuata durante il normale iter diagnostico di routine e di sorveglianza per il cancro del colon-retto.

La diagnosi di CU è basata sui criteri clinici, endoscopici ed istopatologici convenzionali di Lennard-Jones (46). Sono stati considerati soggetti sani i pazienti sottoposti a colonscopia che non presentavano alterazioni macroscopiche della mucosa colica né sintomi gastrointestinali.

Tutti i pazienti affetti da CU presentavano una storia di malattia superiore ai 10 anni dalla diagnosi (durata media di malattia  $11.9 \pm 1.2$  anni). Tali pazienti sono stati sottoposti ad una preliminare colonscopia con prelievi biotici, in corso di attività di malattia, e ad una seconda indagine endoscopica con biopsie, in fase di remissione di malattia, ottenuta con terapia steroidea (1mg/Kg/die), e successivamente mantenuta mediante terapia con mesalazina (3,2 gr/die).

La remissione clinica di malattia è stata confermata mediante valutazione istopatologia.

Tutti i campioni ottenuti sono stati fissati in formalina e successivamente incorporati in paraffina per la valutazione istologica.

### **Linee cellulari e trattamenti**

Le linee cellulari HepG2, SW1990, e LS174T sono state ottenute dall'American Type Culture Collection (ATCC) e poste in coltura con il Dulbecco's Modified Eagle Medium -

DMEM (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) supplementato con il 10% di siero fetale bovino (FBS) (Sigma-Aldrich), 2 mM di L-glutamina (Sigma-Aldrich), 100 U/mL di penicillina e 100 mg/mL di streptomina (Sigma-Aldrich).

La linea cellulare NCM460 è stata ottenuta dalla INCELL Corporation (San Antonio, TX, USA) ed è stata posta in coltura con base M3 (INCELL Corporation). Tutte le linee cellulari sono cresciute in monostrato a 37°C in atmosfera umidificata contenente il 5% CO<sub>2</sub>.

### **Colorazione argentea selettiva delle NOR (regioni dell'organizzatore nucleolare) – AgNOR**

La colorazione AgNOR è stata effettuata seguendo le procedure standard (47). I vetrini sono stati spostati dall'acqua a vaschette di plastica termoresistenti di Coplin, completamente immerse in un tampone 10 mM di citrato di sodio (pH 6,0), e sterilizzate a 120 °C per 20 minuti. Dopo il raffreddamento a temperatura ambiente in tampone di citrato di sodio, i vetrini sono stati colorati con argento per 13 minuti a 37 ° C al buio, utilizzando una soluzione di un volume di 2% di gelatina in 1% acido formico acquoso e due volumi di nitrato d'argento al 50%.

Infine, le sezioni sono state disidratate e montate in “*Canada balsam*”, senza contrasto. L'analisi morfometrica dell'AgNORs è stata effettuata utilizzando il programma *Image-Pro Plus* (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Per ogni campione, l'area AgNOR è stata misurata di almeno 200 nuclei e l'area media di AgNOR (SD) è stata calcolata.

### **Analisi immunoistochimica**

I campioni di tessuto sono stati tagliati in sezioni di 4-micron e successivamente deparaffinati e reidratati con concentrazioni decrescenti di etanolo. Gli antigeni sono stati isolati con tampone citrato con pH = 6 a 120 °C, in 1 atm per 21 minuti o con EDTA con pH =

9 a 98 °C per 20 minuti, a seconda dell'anticorpo utilizzato. Un metodo non-biotina amplificato (NovoLink™ Polymer Detection System, Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle Upon Tyne, UK) è stato utilizzato per la visualizzazione degli antigeni sulle sezioni di tessuto.

Le sezioni sono state poi incubate durante la notte a 4 °C con un anticorpo primario anti-Ki-67 (clone MIB-1; Laboratories BioGenex, San Ramon, CA), anti-E-caderina (Dako, Glostrup, Danimarca), e anti-p53 (Novocastra). Le fette sono state poi contrastate con ematossilina, disidratate e coperte. L'Immunostaining nucleare di p53 è stato valutato contando il numero di cellule positivamente colorate ogni 1000 cellule epiteliali di sezioni di mucosa normale e di CU.

### **Immunofluorescenza**

Le sezioni sono state deparaffinate, idratate con concentrazioni decrescenti di etanolo, sciacquate in acqua distillata, e sottoposte a trattamento per recupero dell'antigene. I campioni sono stati lavati in PBS e poi incubati per 30 min in PBS più 1% di albumina sierica bovina (Sigma-Aldrich) per bloccare eventuali legami non specifici, poi incubati durante la notte a 4 °C con l'anticorpo primario anti-SLUG (clone L40C6, Cell Technology Signaling) e anti-E-caderina (clone 32A8, Tecnologia delle celle Signaling), diluiti in PBS più 1% di albumina sierica bovina.

Successivamente, i campioni sono stati lavati in PBS e poi incubati con isotiocianato di fluoresceina (FITC)- coniugato con anticorpo secondario anti-topo (Dako) per 45 min a 37 °C al buio in una camera umidificata. Il montaggio e il contrasto dei nuclei sono state eseguiti utilizzando il "*Pro long antifade reagent with DAPI*" (Molecular Probes, Invitrogen) e osservati sotto un microscopio a fluorescenza (Carl Zeiss Italia, Milano, Italia).



## **Espressione dell'RNA**

L'RNA totale è stato estratto con reagente TRI (Ambion, Austin, TX, USA) e le misurazioni mediante real-time PCR sono state eseguite come precedentemente descritto (48). L'mRNA  $\beta$ -glucuronidasi sono stati quantificati mediante Saggi TaqMan primers di espressione genica e kit sonda (Applied Biosystems); primers per analisi con real-time PCR SYBR Green del 45S rRNA umano, sono stati progettati utilizzando lo strumento Roche di progettazione on-line per primer.

## **Analisi statistica**

Il test  $\chi^2$  o Mann-Whitney U, quando necessari, sono stati utilizzati per eseguire le valutazioni tra i differenti gruppi. L'accordo tra i dati è stato stimato dal  $\kappa$  statistico. Tutte le valutazioni statistiche sono state ottenute utilizzando il software statistico SPSS (SPSS, Inc.). Valori di  $P < 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi.

## RISULTATI

Allo scopo di valutare se avviene una up-regolazione dell'attività trascrizionale dell'rRNA nelle cellule epiteliali della mucosa colica in pazienti affetti da colite ulcerosa, abbiamo misurato la dimensione nucleolare di tali cellule utilizzando sezioni istologiche di campioni biotici, colorando selettivamente le proteine mediante AgNOR. Questa tecnica permette di valutare perfettamente i nucleoli, anche i più piccoli, ed in particolare valutare in modo preciso le dimensioni dei nucleoli (49). Poiché le dimensioni nucleolari sono direttamente correlate all'attività trascrizionale dell'rRNA (47), da tali dimensioni possiamo ricavare informazioni sugli eventuali cambiamenti nella biogenesi ribosomiale nella colite ulcerosa. Dopo colorazione, le caratteristiche istologiche della mucosa colica normale sono perfettamente riconoscibili (figura 1A). La mucosa colica con colite ulcerosa è invece caratterizzata da un diffuso infiltrato infiammatorio a carico della lamina propria, associato a una perdita parziale dello strato superficiale dell'epitelio e a una distorsione dell'architettura ghiandolare (figura 1B).

A maggiore ingrandimento è possibile osservare che le cellule epiteliali di cripte normali presentano nucleoli di piccole dimensioni (figura 1C), mentre nella colite ulcerosa si osservano nucleoli di maggiori dimensioni (figura 1D). L'analisi morfometrica e statistica su 5 campioni normali e 10 campioni di colite ulcerosa conferma questo dato. In accordo con dati precedenti (50), abbiamo notato che, mentre nella mucosa colica normale le cellule proliferative (come evidenziato dall'immunoistochimica con il Ki67) sono confinate nel terzo inferiore delle cripte, nella colite ulcerosa sono distribuite lungo tutta la lunghezza delle cripte.

Tuttavia, è importante segnalare che i nucleoli ipertrofici caratterizzano anche le cellule epiteliali dello strato superficiale della mucosa colica con colite ulcerosa se comparata con quelle della mucosa normale (figura 1E e 1F), le quali non risultano essere proliferative. Questi

risultati suggeriscono che nella mucosa infiammata vengono rilasciati fattori che stimolano la biogenesi ribosomiale e ciò avviene indipendentemente dalla stimolazione cellulare alla proliferazione.

La correlazione tra ipertrofia nucleolare delle cellule epiteliali della mucosa colica nella colite ulcerosa e i processi infiammatori è stata anche dimostrata dall'evidenza che tali dimensioni nucleolari si riducono dopo terapia con 5-ASA (Figura 2).

Successivamente, abbiamo valutato l'espressione della p53 in sezioni istologiche di campioni biopsici di mucosa sana ed infiammata. Abbiamo riscontrato che nella mucosa colica normale la marcatura era presente maggiormente nelle cellule epiteliali della porzione inferiore delle cripte (figura 1, G e I).

L'indice di marcatura (Label Index, LI) delle cellule epiteliali all'interno delle cripte è di 24.5. La stessa localizzazione di marcatura è stata evidenziata nella mucosa colica dei pazienti affetti da colite ulcerosa (Figura 1, H e L), anche se la percentuale di marcatura è inferiore (LI = 9.8); indicando una down-regolazione dell'espressione della p53 nelle cellule epiteliali di mucosa colica affetta da CU.

Questi risultati sono compatibili con recenti studi in cui è stato osservato che l'espressione delle p53 nelle cellule epiteliali di mucosa colica umana sana è più alto di quello riscontrato in pazienti affetti da colite ulcerosa con displasia o lesioni cancerose (51).

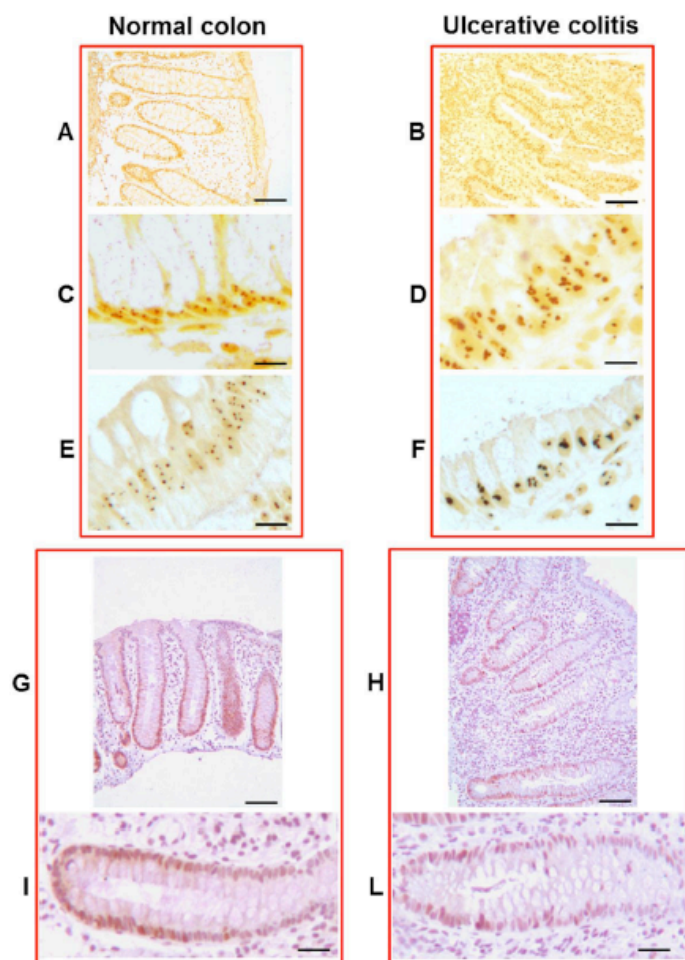


Figura 1: Up-regolazione della biogenesi ribosomiale e down-regolazione di p53 nelle cellule epiteliali della mucosa del colon di pazienti affetti da colite ulcerosa.

(A-F) Sezioni di campioni istologici di mucosa di colon normale e di colon di pazienti affetti da CU dopo colorazione argentea per la visualizzazione selettiva dei nucleoli. A basso ingrandimento, l'architettura della mucosa normale (A) e della mucosa con CU (B) è perfettamente riconoscibile. E' presente un'iperproliferazione cellulare nella lamina propria della mucosa con CU, rispetto alla mucosa normale. Barra = 100  $\mu$ m. A maggiore ingrandimento, i nucleoli appaiono intensamente colorati. La dimensione dei nucleoli delle cellule epiteliali delle cripte nella mucosa normale (C) è inferiore a quella dei nucleoli delle cellule epiteliali nella CU (D), e nelle cellule epiteliali dello strato superficiale della mucosa (cfr. E con F). Barra = 10  $\mu$ m. (G, H) sezioni di mucosa di colon normale e con CU, trattate con anticorpi monoclonali anti-p53 mediante reazione enzimatica perossidasi / DAB. Barra = 100  $\mu$ m. (I) A maggiore ingrandimento, la maggior parte de nuclei delle cellule epiteliali della porzione inferiore delle cripte della mucosa del colon normale sono colorate rosso mattone, questo indica un accumulo di p53. Nelle cellule epiteliali della mucosa con CU è presente una minore colorazione per p53 (L). Barra = 25  $\mu$ m (E/E).

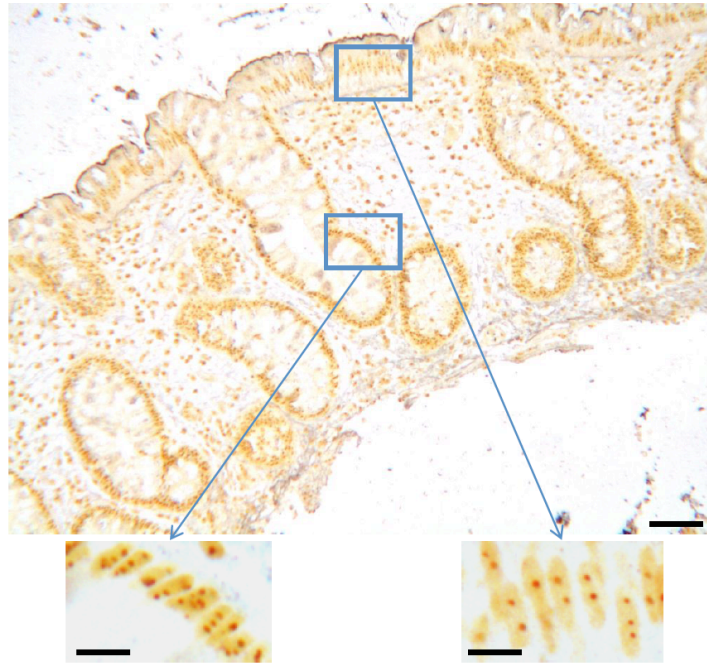


Figura 2: Sezione istologica dalla mucosa del colon di un paziente affetto da CU dopo trattamento con terapia anti-infiammatoria. Colorazione argentea per la visualizzazione selettiva dei nucleoli. L'iperproliferazione cellulare non è più presente nella lamina propria (Barra = 70  $\mu\text{m}$ ). Inserti: i nucleoli delle cellule epiteliali delle cripte e dello strato superficiale della mucosa presentano la stessa dimensione dei nucleoli della mucosa normale. Dimensioni dei nucleoli delle cellule epiteliali delle cripte =  $2.45 \pm 0.99 \mu\text{m}^2$ , dei nucleoli delle cellule epiteliali dello strato superficiale =  $1.22 \pm 0.65 \mu\text{m}^2$ . (vd. figura 1C ed E). Barra = 10  $\mu\text{m}$ .

#### *IL-6 stimola la trascrizione dell'rRNA*

Durante questo studio abbiamo analizzato l'effetto dell'IL-6 sulla biogenesi ribosomiale e sulla espressione della p53 in 4 diverse linee cellulari epiteliali umane: una di epitelio colico normale (NCM460 cell line), una di un cancro del colon (LS174T cell line), una proveniente da carcinoma epaticellulare (HepG2 cell line), ed una di cancro del pancreas (SW1990 cell line).

Le variazioni nell'attività trascrizionale dell'rRNA in queste 4 linee cellulari, esposte a IL-6 alla dose di 50ng/ml per 24 ore, sono state valutate analizzando l'espressione del 45S pre-rRNA mediante qRT-PCR (Figura 3).

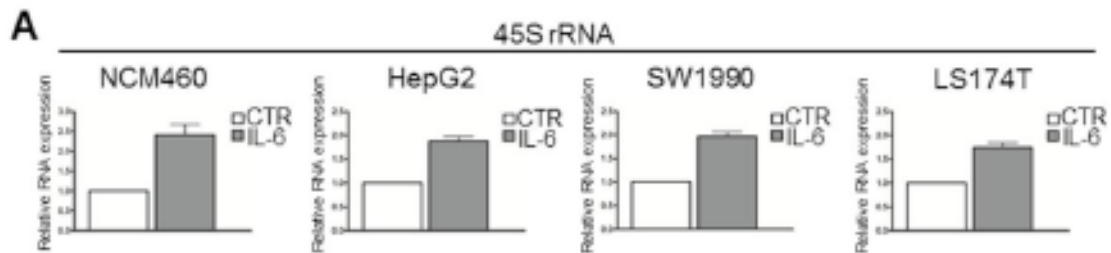


Figura 3: Down-regolazione dell'espressione e dell'attività di p53 in linee cellulari esposte all'IL-6. Analisi mediante real-time PCR dell'espressione del 45S rRNA di p53 nelle linee cellulari NCM460, HepG2, SW1990 e LS174T dopo 24 ore di trattamento con IL-6 con una dose di 50 ng / ml.

*IL-6 induce l'epitelio mesenchimale di transizione mediante down-regolazione dell'espressione di p53*

La perdita di stabili contatti cellula-cellula e della polarità cellulare è una caratteristica di trasformazione neoplastica. Nei tessuti epiteliali normali questa funzione è sostenuta principalmente dal complesso E-caderina-catenina (52-53).

Una down-regolazione dell'espressione delle E-caderine si verifica molto frequentemente durante la progressione dei tumori epiteliali maligni (54), e la perdita dell'espressione delle E-caderine è responsabile della la perdita di adesione intercellulare durante invasione (55).

L'espressione delle E-caderine è repressa dal fattore di trascrizione SLUG, responsabile della transizione epiteliale- mesenchimale (56).

*L'espressione delle E-caderine è ridotta nelle cellule epiteliali della mucosa colica umana nella colite ulcerosa.*

Dati ottenuti in esperimenti condotti utilizzando linee cellulari epiteliali indicano che la stimolazione della sintesi di rRNA indotta dall'IL-6, causa una down-regolazione dell'espressione di p53 con la conseguente attivazione del meccanismo EMT. Ci siamo chiesti se simili cambiamenti avvengono anche nelle cellule epiteliali del colon di pazienti con colite ulcerosa, caratterizzati da un up-regolazione della biogenesi ribosomiale.

Abbiamo pertanto analizzato l'espressione delle E-caderine in preparati istologici trattati con immuno-perossidasi ed immuno-fluorescenza. L'analisi delle E-caderine, utilizzando la tecnica di immuno-perossidasi, mostra che la mucosa sana è caratterizzata da un segnale intenso, presente nei confini di tutte le cellule epiteliali delle cripte e dello strato superficiale (Figura 4, A e B). Per quanto riguarda i campioni di colite ulcerosa, il segnale è generalmente più debole (Figura 4C).

Inoltre, in molte cripte, alcuni gruppi di cellule epiteliali espongono una colorazione per le E-caderine mentre le cellule epiteliali contigue sono completamente prive di segnale (Figura 4D). Gli stessi risultati sono stati ottenuti con l'analisi di immuno-fluorescenza (Figura 4, E, F, G e H). In campioni di colon di pazienti affetti da CU e trattati con farmaci anti-infiammatori, l'espressione dell'E-caderina è risultata sovrapponibile a quella del gruppo controllo, di mucosa colica normale (Figura 5).

Pertanto, questi risultati indicano la presenza di una riduzione delle E-caderine nelle cellule epiteliali del colon umano con colite ulcerosa, come conseguenza di un processo infiammatorio.

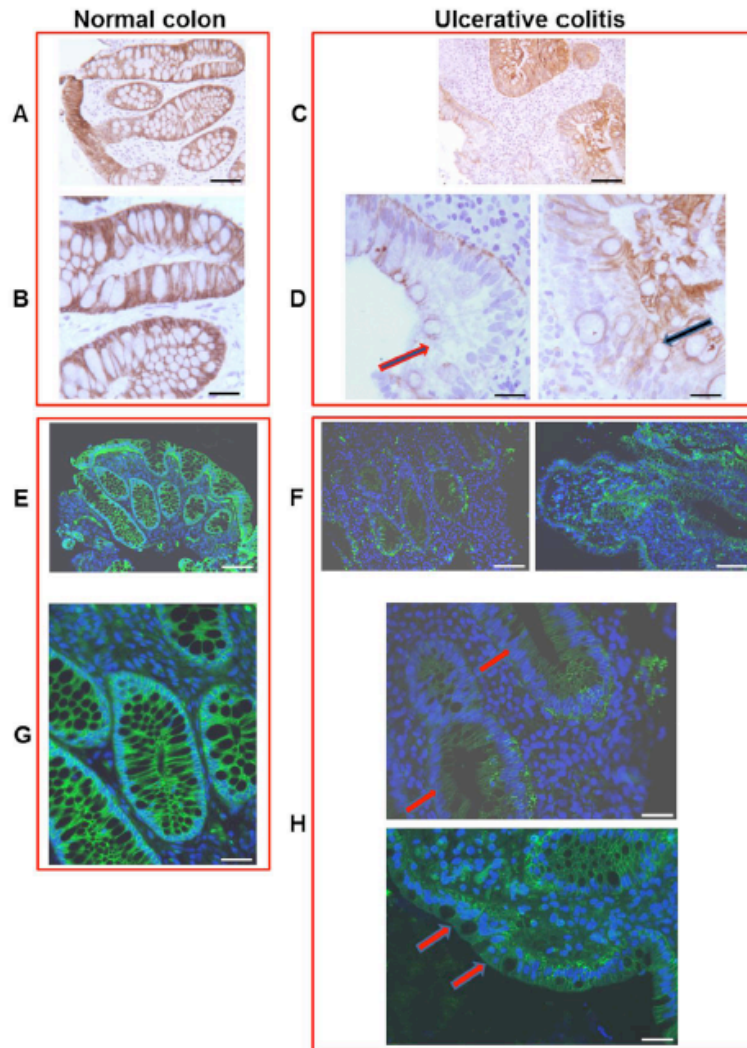


Figura 4: Le E-caderine sono ridotte nelle cellule epiteliali della mucosa del colon di pazienti affetti da CU. (AD) Immunoistochimica con anticorpi anti-E-caderine, mediante reazione enzimatica perossidasi/DAB. Nella mucosa normale, tutte le cellule epiteliali delle cripte e dello strato superficiale presentano una colorazione intensa (A: Barra = 80  $\mu$ m; B: Barra = 20  $\mu$ m). Nella mucosa di pazienti affetti da CU, l'intensità di colorazione appare ridotta e in alcune zone non è presente colorazione (C: scala 80  $\mu$ m; D: scala, 20  $\mu$ m). Le frecce indicano le cellule epiteliali con ridotta o assente colorazione delle E-caderine. Analisi con colorazione mediante E/E. Immunoistochimica con anticorpi anti-E-caderine, mediante coniugazione di anticorpi secondari Fitch. Colorazione nucleare DAPI. Le E-caderine sono caratterizzate da una intensa fluorescenza giallo-verde. Tutte le cellule epiteliali della mucosa normale sono colorate intensamente (E), mentre nella CU sono presenti alcune cellule epiteliali delle cripte e dello strato superficiale non colorate (F). Barra = 100  $\mu$ m. L'immuno-colorazione delle E-caderine delinea perfettamente i contorni delle cellule della mucosa normale (G). Questa colorazione non è presente in alcune cellule epiteliali delle cripte e dello strato superficiale della mucosa dei pazienti affetti da CU (frecce) (H). Barra = 20  $\mu$ m.



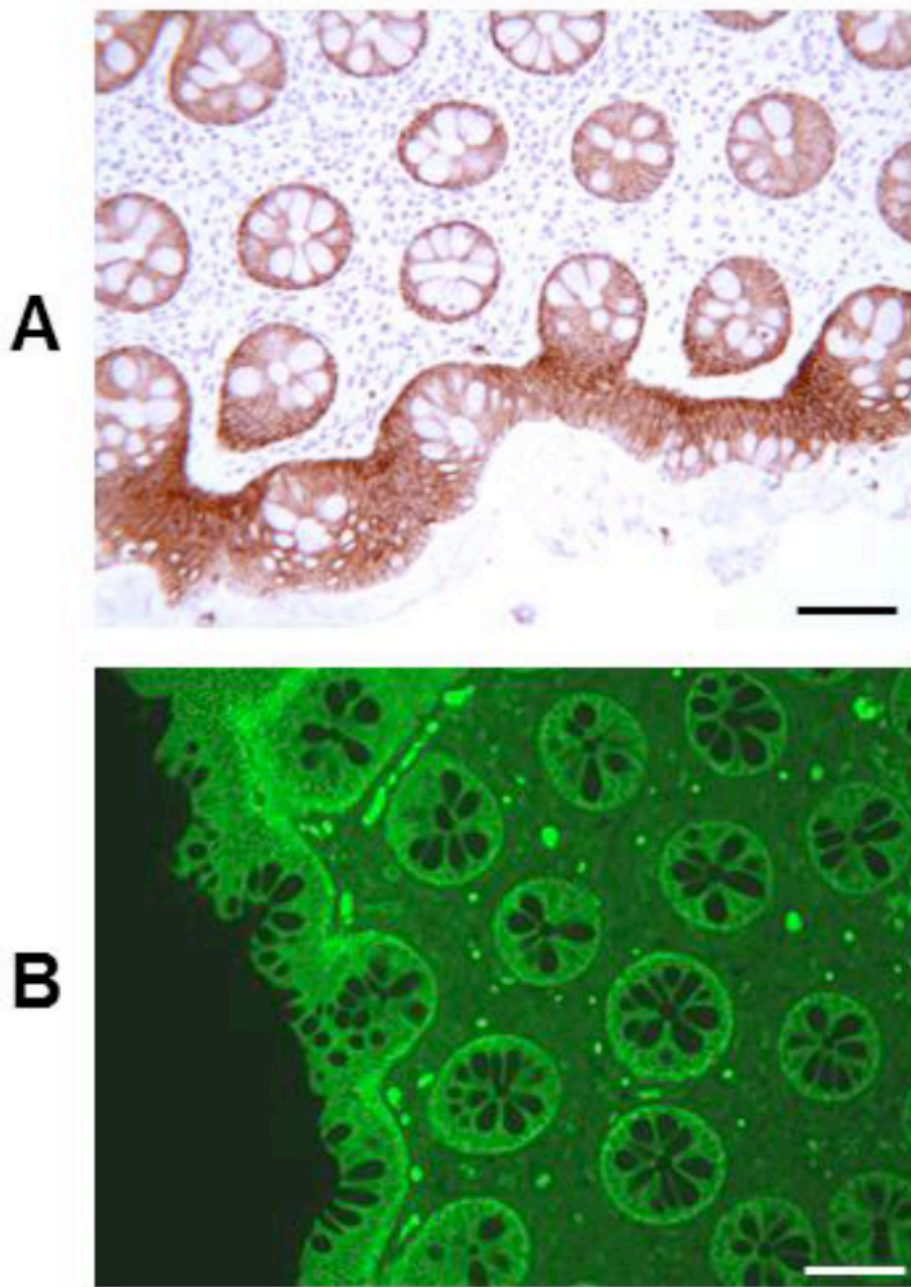


Figura 5: Immagine che mostra le E-caderine nelle cellule epiteliali della mucosa del colon di un paziente affetto da CU trattato con terapia anti-infiammatoria. Immunoistochimica con anticorpi anti-E-caderine, mediante reazione enzimatica perossidasi / DAB. Tutte le cellule epiteliali delle cripte e dello strato superficiale presentano contorni caratterizzati da una intensa colorazione. (B) Immunostaining con anticorpi anti-E-caderine, mediante coniugazione di anticorpi secondari Fitch. Tutte le cellule epiteliali della mucosa del colon presentano una intensa colorazione. Barra =100 µm.

## DISCUSSIONE

I risultati di questo studio evidenziano un nuovo meccanismo che collega l'infiammazione al cancro, che viene attivato mediante l'aumento della trascrizione di rRNA sotto esposizione a IL-6. Abbiamo riscontrato che i colociti dei pazienti affetti da colite ulcerosa sono caratterizzati da:

- (i) ipertrofia nucleolare, che indica una up-regolazione della sintesi di rRNA (47),
- (ii) down-regolazione dell'espressione di p53 e
- (iii) riduzione dell'espressione delle E-caderine, variazione fenotipica che indica l'attivazione del meccanismo EMT (57).

La riduzione dei livelli di proteina p53 è associata a una diminuzione della funzione di p53, che attiva il meccanismo EMT e aumenta il potenziale di invasività delle cellule esposte ad IL-6. La down-regolazione dell'espressione della p53 è dovuta esclusivamente ad una up-regolazione della biogenesi ribosomiale.

Mediante valutazione immunohistochimica abbiamo riscontrato la presenza di una marcata ipertrofia nucleolare – segno morfologico di una up-regolazione della trascrizione dell'rRNA (47) – associata ad una riduzione della p53, nelle cellule epiteliali di tutti i casi esaminati di CU.

Il nucleolo è la regione del nucleo cellulare, dove avviene la biogenesi ribosomiale (58-59). Esso è presente nelle fasi del ciclo cellulare G1, S e G2, e interviene in importanti attività cellulari, come ad esempio il trasferimento dell'rRNA messaggero (mRNA) dal nucleo al citoplasma.

Un'ipertrofia nucleolare e un'aumentata biogenesi ribosomiale sono state osservate in corso di una iperproliferazione cellulare (60).

Questa peculiarità è spesso presente nelle cellule neoplastiche in cui, alterazioni nella

regolazione di soppressori tumorali e proto-oncogeni inducono una non controllata proliferazione cellulare e, di conseguenza, una stimolazione della biogenesi ribosomiale (61-62).

Dati in letteratura dimostrano una stretta correlazione tra ipertrofia nucleolare e alterazione dell'espressione della p53 (63). Una riduzione della p53 comporta un'instabilità genetica nelle cellule tumorali ed è stato dimostrato che è responsabile di una stimolazione alla biogenesi ribosomiale (64-65).

Studi in letteratura hanno dimostrato che l'IL-6 aumenta la trascrizione dell'rRNA attraverso l'induzione dell'espressione della proteina c-myc a livello post-trascrizionale in modo STAT-3 dipendente e che la sintesi dell'rRNA up-regolato riduce l'espressione e la funzione della p53 attraverso una sua degradazione mediante le ribonucleoproteine MDM2 (66-67).

Vi sono evidenze di come STAT3 giochi un ruolo cruciale nell'infiammazione associata alla tumorigenesi del colon e del fegato (32, 37-39), e che IL-6 è il principale attivatore di STAT3, stimolante la trascrizione di geni bersaglio i cui prodotti aumentano la proliferazione cellulare e la sopravvivenza (68).

Complessivamente, i nostri risultati indicano che IL-6 può contribuire alla tumorigenesi:

- i) inducendo un aumento della proliferazione e della sopravvivenza cellulare, attivando il pathway STAT3 (68), e
- ii) mediante una down-regolazione di p53, attivando il pathway MAPK.

Quest'ultimo effetto può essere di primaria importanza nel processo di trasformazione delle cellule dei tessuti infiammati. Infatti, le cellule infiammatorie mediante la produzione di citochine, chemochine e fattori di crescita stimolanti la proliferazione e l'attività anti-apoptotica, generano specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (6) che causano danni ossidativi

del DNA. Questi ultimi non possono più essere adeguatamente riparati, a causa della down-regolazione della funzione di p53. Questo processo può comportare alterazioni epigenetiche sia di oncogeni sia di altri geni oncosoppressori responsabili della trasformazione neoplastica e della progressione (Figura 6).

Questo meccanismo può essere attivo in tutti i foci infiammatori dove viene prodotta l'IL-6 e in cui tale IL induce una up-regolazione dell'attività nucleolare, analogamente a quanto avviene nelle cellule epiteliali dello strato superficiale e delle cripte della mucosa colica umana con colite ulcerosa.

In effetti, è stato dimostrato che gli epatociti umani nelle epatiti-cirrosi virali sono caratterizzati da una marcata ipertrofia nucleolare. Questa caratteristica, anche se direttamente associata a un aumentato rischio di sviluppo di epatocarcinoma non è esclusiva (69).

L'effetto dell'IL-6 sull'espressione della proteina p53, oltre a chiarire i meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza del cancro nei tessuti infiammati, può anche fare luce sulla natura della relazione tra due condizioni patologiche umane molto diffuse, obesità e diabete di tipo 2 (T2DM), e il cancro. È ormai noto che l'obesità, l'insulino-resistenza e il T2DM, sia separatamente che in combinazione tra loro, sono associati ad un aumentato rischio di sviluppare molti tipi di cancro (70). La ragione di questa associazione è stata studiata in profondità in passato, alla luce del progressivo aumento di obesità e T2DM nella popolazione mondiale. L'obesità è caratterizzata da un aumento dei livelli ematici di una serie di fattori, come gli estrogeni, le citochine (IL-1, IL-6, IL-17 e fattore di necrosi tumorale-alfa), il plasminogeno 1, la leptina, ed una riduzione dei livelli plasmatici di adiponectina (71-74). Questi cambiamenti metabolici giocano un ruolo cruciale nella patogenesi della insulino-resistenza, della sindrome metabolica e del diabete di tipo 2, caratterizzati da una iperinsulinemia ed un aumentato livello di insulin-like growth factor (IGF-1).

E' stato dimostrato che l'insulina e l'IGF-1 possono avere effetti cancerogeni, principalmente legati a una stimolazione della proliferazione cellulare e ad una attività anti-apoptotica (75-77). Pertanto, gli effetti di iperinsulinemia e i livelli plasmatici di IGF-1 sono considerati un importante meccanismo che sottolinea l'associazione tra obesità e diabete di tipo 2, da un lato, ed il cancro, dall'altro (78). In questo contesto, è opportuno notare che, oltre all'IL-6, anche l'insulina e il IGF-1 attuano una down-regolazione dell'espressione e dell'attività di p53, attraverso il meccanismo innescato dalla up-regolazione della biogenesi ribosomiale (48). Pertanto, un'iperproduzione di IL-6, di insulina e di IGF-1 possono cooperare in una down-regolazione di p53 nei tessuti di pazienti obesi e diabetici. Anche se vi è evidenza che il meccanismo biologico che collega obesità ed iperinsulinemia a rischio di cancro non può essere ridotta ad un "unico meccanismo" (70), la riduzione della funzione di p53 può rappresentare un fattore comune a queste malattie, che può favorire l'insorgenza di tumori in aggiunta ad altri fattori come sesso e fattori biologici cancro sito-specifici.

In conclusione, questo studio ha dimostrato che l'IL-6 riduce i livelli di p53 e la conseguente difesa antitumorale delle cellule. E' molto probabile che tale meccanismo giochi un ruolo fondamentale nella trasformazione cellulare. Strategie terapeutiche basate sugli antagonisti del recettore dell'IL-6 potrebbero risultare indicate non solo in quelle patologie infiammatorie con un elevato rischio di insorgenza del cancro, per prevenire lo sviluppo di tumori, ma anche durante il trattamento di tumori mediante chemioterapia adiuvante in quei pazienti che presentano un livello plasmatico elevato di IL-6, al fine di ottenere una migliore risposta terapeutica.

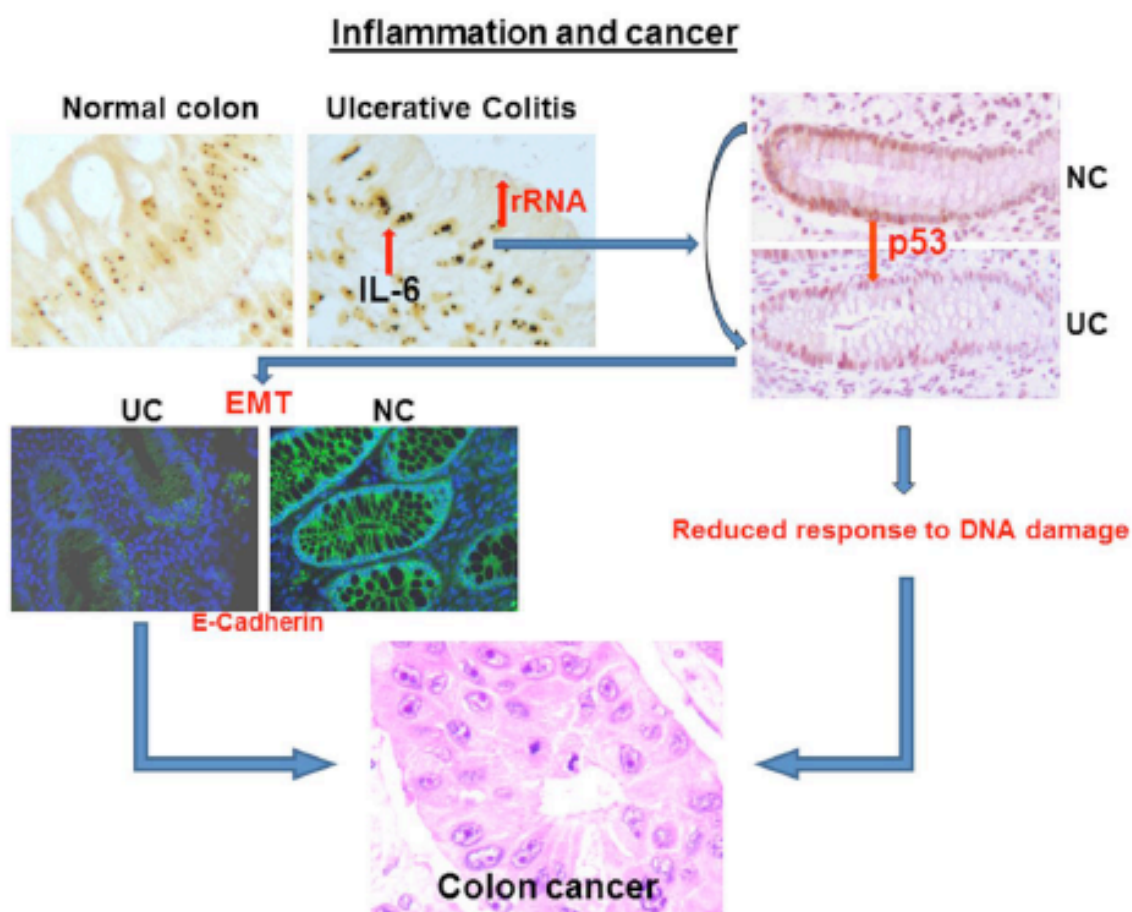


Figura 6: Rappresentazione schematica del pathway IL-6/biogenesi ribosomiale/p53 che collega l'infiammazione al cancro. Nei tessuti infiammati, come la mucosa del colon di pazienti affetti da colite ulcerosa, si ha una produzione di IL-6. L'IL-6 aumenta la biogenesi ribosomiale, che è responsabile di un aumento della degradazione di p53. Questo favorisce il meccanismo epitelio-mesenchimale di transizione (EMT) delle cellule epiteliali del colon e riduce la risposta cellulare al danno del DNA. Questi meccanismi possono entrambi favorire l'insorgenza di cancro.

## BIBLIOGRAFIA

1. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347: 417–429.
2. Gollop JH, Phillips SF, Melton LJ III, *et al.* Epidemiologic aspects of Crohn's disease: a population based study in Olmsted County, Minnesota, 1943–1982. *Gut* 1988; 29: 49–56.
3. Scaldaferri F, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: progress and current concepts of etiopathogenesis. *J Dig Dis* 2007; 8: 171-8.
4. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448: 427-34.
5. Canavan C, Abrams KR, Mayberry J. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23, 1097–1104.
6. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-867.
7. Mantovani A, Allavena P, Sica A, *et al.* Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454: 436-444.
8. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 2007; 117: 1175-1183.
9. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010; 140: 883-899.
10. Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G7–17.
11. Wahl LM, Kleinman HK. Tumor-associated macrophages as targets for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1583–1584.
12. Maeda H, Akaike T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry (Mosc)* 1998; 63: 854–865.

13. Hussain SP, Amstad P, Raja K, *et al.* Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Res* 2000; 60: 3333–3337.
14. Amit S, Ben-Neriah Y. NF-kappaB activation in cancer: a challenge for ubiquitination- and proteasome-based therapeutic approach. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 15–28.
15. Karin M, Cao Y, Greten FR, *et al.* NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 301–310.
16. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002; 3: 221–227.
17. Rogler G, Brand K, Vogl D, *et al.* Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1998; 115: 357–369.
18. Lind DS, Hochwald SN, Malaty J, *et al.* Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery* 2001; 130: 363–369.
19. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759–767.
20. Noubissi FK, Elcheva I, Bhatia N, *et al.* CRD-BP mediates stabilization of betaTrCP1 and c-myc mRNA in response to beta-catenin signalling. *Nature* 2006; 441: 898–901.
21. Jänne PA, Mayer RJ. Chemoprevention of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 1960–1968.
22. Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 11–21.
23. Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 1994; 265: 956–959.
24. Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* 1998; 396: 77–80.



25. Yamamoto Y, Yin MJ, Lin KM, Gaynor RB. Sulindac inhibits activation of the NF-kappaB pathway. *J Biol Chem* 1999; 274: 27307–27314.
26. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 1–21.
27. Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2007; 117: 514–521.
28. Dann SM, Spehlmann ME, Hammond DC, *et al.* IL-6-dependent mucosal protection prevents establishment of a microbial niche for attaching/effacing lesion-forming enteric bacterial pathogens. *J Immunol* 2008; 180: 6816–6826.
29. Atreya R, Neurath MF. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005; 28: 187–196.
30. Becker C, Fantini MC, Schramm C, *et al.* TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 2004; 21: 491–501.
31. Becker C, Fantini MC, Wirtz S, *et al.* IL-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer. *Cell Cycle* 2005; 4: 217–220.
32. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, *et al.* IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 2009; 15: 103–113. *Erratum in: Cancer Cell* 2009 Mar 3; 15(3):241.
33. Allavena P, Sica A, Vecchi A, *et al.* The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues. *Immunol Rev* 2000; 177: 141–149.
34. Schoppmann SF, Birner P, Stöckl J, *et al.* Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 2002; 161: 947–956.

35. Brigati C, Noonan DM, Albini A, *et al.* Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 247–258.
36. Tsung K, Dolan JP, Tsung YL, *et al.* Macrophages as effector cells in interleukin 12-induced T cell-dependent tumor rejection. *Cancer Res* 2002; 62: 5069–5075.
37. Bollrath J, Phesse TJ, von Burstin VA, *et al.* gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* 2009; 15: 91-102.
38. Park EJ, Lee JH, Yu GY, *et al.* Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell* 2010; 140: 197-208.
39. He G, Karin M. NF- $\kappa$ B and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res* 2011; 21: 159-168.
40. Vozarova B, Weyer C, Hanson K, *et al.* Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res* 2001; 9: 414-417.
41. Müller S, Martin S, Koenig W, *et al.* Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF-alpha or its receptors. *Diabetologia* 2002; 45: 805-812.
42. Hjartåker A, Langseth H, Weiderpass E. Obesity and diabetes epidemics: cancer repercussions. *Adv Exp Med Biol* 2008; 630: 72-93.
43. LeRoith D, Novosyadlyy R, Gallagher EJ, *et al.* Obesity and type 2 diabetes are associated with an increased risk of developing cancer and a worse prognosis; epidemiological and mechanistic evidence. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008; 116 Suppl 1: S4-6.
44. Kim S, Keku TO, Martin C, *et al.* Circulating levels of inflammatory cytokines and risk of colorectal adenomas. *Cancer Res* 2008; 68: 323–328.
45. Nakagawa H, Maeda S, Yoshida H, *et al.* Serum IL-6 levels and the risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients: an analysis based on gender

- differences. *Int J Cancer* 2009; 125: 2264-2269.
46. Montanaro L, Treré D, Derenzini M. Nucleolus, ribosomes, and cancer. *Am J Pathol* 2008; 173: 301-310.
  47. Derenzini M, Trere D, Pession A, *et al.* Nucleolar function and size in cancer cells. *Am J Pathol* 1998; 152: 1291–1297.
  48. Donati G, Bertoni S, Brighenti E, *et al.* The balance between rRNA and ribosomal protein synthesis up- and downregulates the tumour suppressor p53 in mammalian cells. *Oncogene* 2011; 30: 3274-3288.
  49. Serafini EP, Kirk AP, Chambers TJ. Rate and pattern of epithelial cell proliferation in ulcerative colitis. *Gut* 1981; 22: 648-652.
  50. Risques RA, Lai LA, Himmetoglu C, *et al.* Ulcerative colitis-associated colorectal cancer arises in a field of short telomeres, senescence, and inflammation. *Cancer Res* 2011; 71: 1669-1679.
  51. Kiuchi N, Nakajima K, Ichiba M, *et al.* STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J Exp Med* 1999; 189: 63-73.
  52. Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 619-627.
  53. Huber O, Bierkamp C, Kemler R. Cadherins and catenins in development. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 685-691.
  54. Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 1999; 24: 73-76.
  55. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, *et al.* A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 1998; 392: 190-193.
  56. Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, *et al.* The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with

- Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* 2003; 116: 499-511.
57. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 442-454.
58. Busch H, Smetana K. The Nucleolus. *New York, Academic Press*, 1970.
59. Hadjiolov AA. The nucleolus and ribosome biogenesis. *Cell Biology Monographs*, vol 12. Vienna, Springer Verlag, 1985, pp 1–267.
60. Derenzini M, Ploton D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *Int Rev Exp Pathol* 1991; 32: 149–192.
61. David-Pfeuty T. The flexible evolutionary anchorage-dependent Pardee's restriction point of mammalian cells: how its deregulation may lead to cancer. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1765: 38–66.
62. Sulic' S, Panic L, Dikic I, *et al*. Deregulation of cell growth and malignant transformation. *Croat Med J* 2005; 46: 622–638.
63. Trere' D, Ceccarelli C, Montanaro L, *et al*. Nucleolar size and activity are related to pRb and p53 status in human breast cancer. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 1601–1607.
64. Cordon-Cardo C. Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* 1995; 147: 545–560.
65. Derenzini M, Ceccarelli C, Santini D, *et al*. The prognostic value of the AgNOR parameter in human breast cancer depends on the pRb and p53 status. *J Clin Pathol* 2004; 57: 755–761.
66. Zhang Y, Lu H. Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer Cell* 2009; 16: 369–377.
67. Deisenroth C, Zhang Y. Ribosome biogenesis surveillance: probing the ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway. *Oncogene* 2010; 29: 4253-4260.
68. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for

- STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 798-809.
69. Trerè D, Borzio M, Morabito A, *et al.* Nucleolar hypertrophy correlates with hepatocellular carcinoma development in cirrhosis due to HBV infection. *Hepatology* 2003; 37: 72-78.
  70. Roberts DL, Dive C, Renehan AG. Biological mechanisms linking obesity and cancer risk: new perspectives. *Annu Rev Med* 2010; 61: 301-316.
  71. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 579-591.
  72. Braun S, Bitton-Worms K, LeRoith D. The link between the metabolic syndrome and cancer. *Int J Biol Sci* 2011; 7: 1003-1015.
  73. Khandekar MJ, Cohen P, Spiegelman BM. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 886-895.
  74. Dalamaga M, Diakopoulos KN, Mantzoros CS. The Role of Adiponectin in Cancer: A Review of *Current Evidence Endocr Rev* 2012; 33: 547-594.
  75. Ish-Shalom D, Christoffersen CT, Vorwerk P, *et al.* Mitogenic properties of insulin and insulin analogues mediated by the insulin receptor. *Diabetologia* 1997; 40 Suppl 2: S25-31.
  76. Prisco M, Romano G, Peruzzi F, *et al.* Insulin and IGF-I receptors signaling in protection from apoptosis. *Horm Metab Res* 1999; 31: 80-89.
  77. Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, *et al.* The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev* 2000; 21: 215-244.
  78. Renehan AG, Frystyk J, Flyvbjerg A. Obesity and cancer risk: the role of the insulin-IGF axis. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17: 328-336.