

Dalla biologia molecolare ai nuovi approcci terapeutici del cancro coloretale: ricerca di base, sperimentazione clinica ed implicazioni chirurgiche

E. GIARNIERI, G. MIDIRI*, V.A. CIROLLA, A. COVOTTA**, L. COVOTTA**, F.M. AVITTO, L. LUZZATTO*, G. MARINO*, S. CONTE*, A. VECCHIONE, V. BELTRAMI**

RIASSUNTO: Dalla biologia molecolare ai nuovi approcci terapeutici del cancro coloretale: ricerca di base, sperimentazione clinica ed implicazioni chirurgiche.

E. GIARNIERI, G. MIDIRI, V.A. CIROLLA, A. COVOTTA, L. COVOTTA, F.M. AVITTO, L. LUZZATTO, G. MARINO, S. CONTE, A. VECCHIONE, V. BELTRAMI

Gli Autori analizzano, attraverso una ampia disamina della letteratura, le moderne conoscenze circa la storia naturale del cancro coloretale nell'ottica biologico-molecolare e genetica.

Vengono passati in rassegna la patogenesi delle cripte aberranti e delle poliposi familiari adenomatose e la oncogenesi dei cancri coloretali di tipo sporadico, anche sulla scorta di esperienze personali circa lo studio e l'applicazione clinica dei geni del sistema di riparazione del DNA.

Pur se dal punto di vista chirurgico non si è ancora in grado di proporre significative variazioni alle tecniche di trattamento fin qui consolidate e coadiuvate, nelle forme più avanzate, da trattamenti radio e chemioterapici di tipo adiuvante o neoadiuvante che non hanno fin qui consentito significativi miglioramenti per ciò che attiene periodo libero da malattia e sopravvivenza, al momento non è ancora affidabile una terapia genica radicale che possa portare alla reintroduzione nelle cellule di un gene difettoso reso funzionale. Sono comunque allo studio farmaci apparentemente in grado di agire in maniera preventiva e sulla evoluzione dei cancri coloretali di tipo sporadico e sui precursori.

SUMMARY: From molecular biology to new treatment plannings for colorectal cancer: basis knowledges, experimental trials and surgery.

E. GIARNIERI, G. MIDIRI, V.A. CIROLLA, A. COVOTTA, L. COVOTTA, F.M. AVITTO, L. LUZZATTO, G. MARINO, S. CONTE, A. VECCHIONE, V. BELTRAMI

The Authors review the natural history of colorectal cancer from the point of view of molecular biology and genetics from aberrant crypts foci and familiar adenomatous polyposis to hereditary non polyposis colon cancer and sporadic colorectal cancer.

They carry out international literature about basis knowledges, experimental trials and personal studies.

Up to day traditional colorectal cancer surgical treatments and adjuvant or neoadjuvant pharmacological therapy cannot be modified, nevertheless "new drugs generation" known as signal transduction inhibitor could, in the future, prove to be an effective cancer treatment. The Authors highlight recent experimental clinical trials probably able to prevent sporadic colorectal cancer spreading and precursor evolution.

KEY WORDS: Cancro coloretale - Biologia molecolare - Protocolli di trattamento.
Colorectal cancer - Molecular biology - Treatment plannings.

Introduzione

Il cancro del colon-retto, così come altre forme neoplastiche, origina da cellule esposte ad una multi-

tudine di "insulti genotossici" in grado di forzare la cellula verso una proliferazione clonale incontrollata.

Si stima che nel colon-retto occorrono da 3 a 8 "mutazioni chiave" per la trasformazione di una cellula normale in una neoplastica.

Lipotesi che il carcinoma coloretale (CRC) sia un processo "multistep" anche da un punto di vista genetico è stata avanzata da un lavoro pionieristico di Vogelstein (21).

Da allora si è progressivamente tentato di documentare, da un punto di vista biologico molecolare,

Università degli Studi "La Sapienza" - Roma
II Facoltà di Medicina e Chirurgia - Oncologia - Ospedale Sant'Andrea
(Direttore: Prof. A. Vecchione)
*II Facoltà di Medicina e Chirurgia - Chirurgia Generale B - Ospedale Sant'Andrea
(Direttore: Prof. L. Angelini)
**I Facoltà di Medicina e Chirurgia
Dipartimento di Scienze Chirurgiche - Sezione Chirurgia Generale e Toracica
(Direttore: Prof. V. Beltrami)
by grant of MIUR

© Copyright 2003, CIC Edizioni Internazionali, Roma

un modello oncogenetico e di crescita in sincronia con i vari aspetti morfo-strutturali di progressione neoplastica a partire dalla mucosa colica normale passando per le cripte aberranti, i polipi adenomatosi displastici, il carcinoma in situ e la forma invasiva.

Sappiamo che le cripte aberranti vengono ormai considerate come le lesioni più precoci di una potenziale evoluzione neoplastica della mucosa colica. Identificate come aree ipercellulari, con alterazione della produzione di mucina, frequenti mitosi ed iniziali irregolarità cellulari, esse sono evidenziabili sulla mucosa colica attraverso l'impiego di coloranti vitali.

Sul piano biologico è possibile riscontrare a questo livello una iperespressione dell'antigene carcinoembrionario e mutazioni del gene APC (36).

La poliposi familiare adenomatosa è un disordine autosomico dominante causato da mutazioni del gene APC.

I pazienti sviluppano verso la seconda e terza decade di vita numerosi polipi adenomatosi che sono strutturalmente identici a quelli riscontrati nei pazienti con poliposi sporadica, ma, anche a causa della quantità, con un rischio di trasformazione neoplastica a 40 anni in una percentuale del 100% dei casi (36,51).

Pur se ad alta penetranza, il disordine genetico alla base di tale malattia presenta comunque una bassa incidenza, pari a meno dell'1% di tutti i casi di carcinoma coloretale, e spesso comporta l'associazione di alterazioni morfo-strutturali di altri apparati, anche in senso neoplastico (36, 51).

Esistono forme di poliposi ereditarie "attenuate" dove il numero di polipi, irregolarmente distribuiti, è minore e nelle quali il gene APC mostra mutazioni a livello della regione terminale, rispetto alla forma più aggressiva dove le mutazioni sono prevalenti sull'esone 15 (3, 6, 38).

Il cancro coloretale di tipo ereditario non associato a poliposi (HNPCC), descritto inizialmente da Warthin nel 1913 e quindi in studi più recenti di Lynch nel 1970 e 1980, è una variante tutt'altro che infrequente (1, 32-34). Trasmesso con carattere autosomico dominante, esso rappresenta più del 5% di tutti i carcinomi colorettali.

La caratteristica di questi pazienti è la tendenza a sviluppare carcinomi colorettali in età sempre più giovane e spesso in sedi diverse (endometrio, ovaio, tratto urinario, stomaco, mammella, sistema biliare) (1, 32-34, 51).

Tuttavia le difficoltà di inquadrare questa sindrome sul piano clinico in base ad inconfutabili criteri di valutazione (criteri di Amsterdam 1991 e di Bethesda 1997 porta probabilmente ad errori di stima circa l'esatta incidenza (36).

Studi di analisi genetico-molecolare su soggetti appartenenti a famiglie con cancro coloretale di pro-

babile matrice ereditaria non associato a poliposi hanno evidenziato come due regioni cromosomiche, la 2p16 e la 3p21, siano frequentemente coinvolte in questa sindrome ed in particolare cinque differenti geni, MSH2, MLH1, PMS1, PMS2, MSH6, che regolano il *network* di riparo del DNA, definiti come "mismatch repair" (37). Questo sistema ripara durante la replicazione del DNA gli errori di disappaiamento delle basi, causati da slittamento.

Le mutazioni dei geni MSH2 e MLH1 appaiono comunque più frequentemente e sembrerebbero implicate anche nella oncogenesi dei cancri di tipo sporadico (25).

La trasmissione di uno degli alleli con il gene mutato riduce l'efficienza del sistema di riparazione ancor più quando anche il secondo allele darà luogo a nuove mutazioni facilitando la comparsa di alterazioni su altri geni.

La disponibilità di tests per la diagnosi di HNPCC ha portato ad un salto qualitativo da un punto di vista diagnostico attraverso l'analisi di instabilità dei microsatelliti e l'analisi mutazionale dei geni MLH1 e MSH2 associati alla loro espressione immunocitochimica (31, 32). Ciò renderà probabilmente più credibili e confrontabili gli attuali criteri clinici classificativi.

Il carcinoma coloretale di tipo sporadico, che include la maggioranza dei casi, tende ad insorgere prevalentemente nell'età avanzata in base alla teoria suddescritta, secondo la quale una cellula deve avere il tempo necessario per accumulare una serie di difetti genetici su oncogeni e geni oncosoppressori (3). A tale supposizione si è giunti mediante lo studio citogenetico e biologico molecolare di particolari stati funzionali genici, come metilazioni e delezioni cromosomiche, usando marker microsatellitari.

L'ipermetilazione o ipermetilazione di *promoter* genici e il loro stato funzionale in termini di espressione sono stati ampiamente documentati in molti tumori umani. Il meccanismo patologico della metilazione è in grado di "accendere" o "spegnere" in maniera inappropriata oncogeni e antioncogeni con conseguenti effetti sull'oncogenesi.

L'ipometilazione nel cancro coloretale è un processo precoce essendo stato infatti osservato nei piccoli adenomi. Di contro l'ipermetilazione su geni oncosoppressori può inibire la loro espressione (23, 44).

Recentemente è stata osservata ipermetilazione del gene MLH1, un gene oncosoppressore con proprietà di riparo del DNA, sulla mucosa normale di soggetti anziani ma senza cancro (39). Le zone delete riscontrate riguardano i cromosomi 18q e 17p, osservate in circa il 75 e 80% dei casi, 8p nel 50% e 1q, 4p, 5q, 6p, 6q, 9q, 18p e 22q fra il 25 ed il 50% dei casi (50).

Queste zone furono successivamente clonate ottenendo da queste i geni che oggi conosciamo come K-

ras, p53, APC, DCC, cioè quei geni che più frequentemente vengono riscontrati alterati in pazienti affetti da cancro coloretale e che esamineremo più attentamente (7, 10, 22, 30).

L'espressione mutazionale su uno o più geni può incrementare a cascata il rischio di mutazioni su ulteriori geni, alterando la normale funzione apoptotica cellulare ed in definitiva il ciclo cellulare.

Esistono quindi molti altri geni che possono essere coinvolti in tale processo; su di essi sono ancora in corso approfondimenti clinico-sperimentali assai interessanti.

K-ras

K-ras è uno dei tre oncogeni (H, N, K-ras) coinvolti nella oncogenesi, codifica per una proteina di 21kd, considerata una tirosin-chinasi, attiva una proteina chiamata p21 capace di mantenere nei tumori lo stato di proliferazione ed è trovato mutato in circa il 40% degli adenomi dopo la perdita del gene APC ma prima di p53.

Il suo valore prognostico è legato alla aggressività della neoplasia.

Gnanasampanthan ha riportato, in un lavoro retrospettivo su 430 pazienti con CRC in stadio C di Dukes, un ruolo importante per il tipo di mutazione del gene K-ras in relazione al tipo di trattamento adiuvante con 5 fluoruracile. Dal tipo di mutazione riscontrata in questo gene è possibile prevedere maggiori o minori sensibilità al trattamento farmacologico chemioterapico (8, 10, 11, 24, 27).

p53

Circa il 75-80% dei carcinomi coloretali ha una perdita di uno dei due alleli del gene oncosoppressore p53 mentre l'altro presenta mutazioni di vario tipo (4).

Dalla letteratura risulta oggi un ruolo scarsamente definito di tale gene come fattore prognostico nel cancro coloretale. Infatti, mutazioni di p53 sono state identificate in stadi tardivi della evoluzione degli adenomi, come le displasie severe o i carcinomi in situ, ed in uno studio su 1.464 pazienti con CRC mutazioni di p53 furono associate a prognosi peggiore dopo 5 anni di follow up nel 53.4% dei casi che ne erano portatori, mentre il 58% dei casi venne classificato come "p53 wilde type" (29, 43).

APC

Mutazioni costituzionali sono riscontrabili nel gene APC nella poliposi familiare. Tale gene oncosoppressore può essere riscontrato mutato e/o deletato

a livello somatico già nelle cripte aberranti e nell'adenoma sporadico.

APC rappresenta il target genetico più studiato per la sua capacità di regolare meccanismi di adesione cellula-cellula, fondamentali per la trasformazione neoplastica della mucosa colica (20).

Da un punto di vista clinico, l'accertamento di mutazioni di APC a livello costituzionale può avere una validità diagnostica e di prevenzione mentre è ancora discusso il suo ruolo prognostico ed eventualmente la possibilità di pianificare protocolli di trattamento farmacologico strutturati sullo studio delle mutazioni (28).

DCC

Nel 70-80% dei casi di CRC il gene DCC situato sul braccio lungo del cromosoma 18 appare deletato. Questa alterazione compare più tardivamente rispetto ad APC nei piccoli adenomi oltre che nei carcinomi avanzati.

La funzione di questo gene sembra essere associata ad attività di controllo sulla adesività cellulare, la apoptosi ed il ciclo mitotico cellulare (47, 49).

Shibata ha studiato l'espressione di DCC da un punto di vista prognostico in 132 pazienti con CRC in stadio II e III (UICC-TNM). I pazienti in stadio II con espressione di DCC positiva avevano una sopravvivenza a 5 anni del 94.3%, i negativi del 61,6%; mentre i pazienti in stadio III sopravvivevano a 5 anni nel 59.3% dei casi contro il 33.2% di quelli risultati negativi (13, 45).

Altri oncogeni e oncosoppressori

L'oncogene HER2-neu noto nel cancro mammario è invece overespresso nel colon in pochi casi, così come i geni c-myc e c-myb (19).

La loro rilevanza clinica non è pertanto ancora stata accertata (14, 16, 19).

Un ruolo promettente sembrerebbero avere altri fattori come VEGF e EGFR. VEGF, fattore di crescita vascolare o anche conosciuto come fattore di permeabilità vascolare, è fra i più importanti fattori di crescita proangiogenico regolando la permeabilità e la proliferazione delle cellule endoteliali (17).

In vari tipi di tumore, fra cui il CRC, questo gene appare overespresso associandosi ad una ridotta attività apoptotica, incremento della densità microvascolare intratumorale, incremento dell'attività metastatica, ridotta sopravvivenza (4, 17, 19).

Protocolli sperimentali clinico-farmacologici ed implicazioni in chirurgia

Purtroppo dal punto di vista chirurgico non siamo ancora in grado di proporre significative variazioni alle tecniche di trattamento fin qui consolidate circa le poliposi familiari o le sindromi neoplastiche ereditarie senza poliposi o i cancri coloretali di tipo sporadico.

Per le prime, infatti, rimane sicuramente affidabile l'effettuazione di una proctocolectomia con anastomosi ileo-canale anale su reservoir ileale che, se effettuata entro il venticinquesimo anno di età, riduce la possibilità di una evoluzione adenocarcinomatosa a percentuali minime, mentre per le seconde resta valido il controllo clinico-strutturale continuo, almeno fin quando non verranno perfezionate diagnosi sicure di tipo mio-molecolare che per altre forme neoplastiche, come per i cancri della mammella ed i tumori midollari della tiroide, porterebbero a consigliare trattamenti chirurgici preventivi anche di tipo demolitivo (37, 51).

Per i cancri coloretali di tipo sporadico, come è noto, l'oncologia chirurgica riserva trattamenti standardizzati che comportano un dominio locoregionale almeno sul piano morfologico della malattia, coadiuvati, nelle forme più avanzate, da trattamenti radio e chemioterapici di tipo adiuvante o neoadiuvante, che però non hanno fin qui consentito significativi miglioramenti per ciò che attiene al periodo libero da malattia e sopravvivenza. Infatti, al momento non esiste ancora una terapia genica radicale che possa portare alla reintroduzione nelle cellule neoplastiche di un gene difettoso reso funzionale.

Purtuttavia ci pare assai interessante porre all'attenzione di chirurghi e clinici quanto viene oggi giorno effettuato circa l'applicazione, seppur ancora in via sperimentale e presso centri specificatamente autorizzati, di protocolli di trattamento farmacologico emersi dalle ricerche di base di tipo genetico e biologico-molecolare.

In questo contesto la chirurgia non può ancora giocare un ruolo fondamentale, ma le premesse portano a considerare come in un tempo non troppo lontano sia l'endoscopia diagnostica che quella operativa e la chirurgia maggiore verranno sempre più guidate da presupposti di ordine biologico la cui conoscenza non può essere trascurata.

Sono allo studio farmaci apparentemente in grado di agire in maniera preventiva e sulla evoluzione dei cancri coloretali di tipo sporadico e sul divenire dei precursori.

Partiamo quindi da una considerazione apparentemente banale. In maniera del tutto fortuita e sulla base di indagini epidemiologiche, è stato ad esempio osservato che farmaci antinfiammatori del tipo dell'acido acetilsalicilico sarebbero in grado di portare

ad una regressione dei polipi intestinali in alcuni pazienti. Numerose sperimentazioni vengono oggi condotte per rendere applicativa su vasta scala questa ipotesi.

Uno studio di previsione con inibitore selettivo della ciclossigenasi 2 (COX2), quindi potenzialmente meno gastrolesivo rispetto agli altri farmaci antinfiammatori, sembrerebbe promettente come terapia adiuvante nella poliposi familiare soprattutto in funzione della grandezza del polipo (5).

Anche per l'HNPCC e per i cancri coloretali di tipo sporadico la procedura di reintroduzione dei geni funzionanti nelle cellule tumorali è ancora in fase di sperimentazione.

Una nuova generazione di farmaci, alcuni dei quali ad attività peptidomimetica ed altri definiti come *anti-sense* oligonucleotidi, capaci di bloccare l'espressione di molti oncogeni, cominciano ad essere utilizzati nella pratica clinica sperimentale.

Fra le varie attività dell'oncogene K-ras, oltre quella reattiva al controllo sulla proliferazione e sopravvivenza cellulare (11), vi è l'aggiunta di una farnesil ad un sito carbossi-terminale ad opera di una proteina farnesiltransferasi (FPT). Attualmente sono in fase di sviluppo clinico degli inibitori per FPT (52), anche in questo caso in fase adiuvante. Ad esempio, il SCH66336 (*Schering-Plough Research Institute*, Kenilworth, NJ) è un potente peptido-mimetico in grado di inibire FPT che possiede una larga attività preclinica su linee cellulari e su tumori umani, con azione antiproliferativa in sinergia con altri farmaci chemioterapici (2), così come il R11577 (*Janssen Research Foundation*, Titusville, NJ) attualmente in studio per carcinomi coloretali e pancreatici (53).

Differenti strategie sono state messe in atto per inibire l'attività di angiogenesi tumorale attraverso peptidi e anticorpi monoclonali capaci di bloccare il recettore di VEGF (26). Il RhuMab VEGF (Bevacizumab Avastin, *Genetech*, South San Francisco, CA) è un anticorpo monoclonale diretto contro VEGF capace di prevenire l'attivazione di una sua frazione di derivazione VEGFR2. Studi su 104 casi di CRC avanzato non suscettibile di trattamento chirurgico hanno evidenziato che i pazienti trattati con RhuMab VEGF in combinazione con 5FU/LV hanno un incremento statisticamente significativo di risposte alla terapia ed un aumento del tempo di sopravvivenza (9).

Il SU5416 (Semaxinib, *Sugen/Pharmacia*, South San Francisco, CA) è un potente e selettivo inibitore dell'attività tirosin-kinasica di VEGFR2 con attività antiproliferativa sulle cellule endoteliali e quindi sulla angiogenesi. In uno studio di fase 1 e 2 in pazienti affetti da CRC non soggetto a trattamento chirurgico radicale è stata osservata tollerabilità alla combinazio-

ne simultanea con 5FU/LV ed effetti positivi in termini di timing di progressione della malattia e sopravvivenza. È attualmente in corso un trial di fase 3 (18, 42).

Il fattore di crescita epidermoidale EGFR, anche conosciuto come HER1 o erbB1, è stato riscontrato fra i meccanismi che contribuiscono alla crescita tumorale (16).

Molti tumori evidenziano una overespressione di EGFR associandosi ad una peggior prognosi per i pazienti, alto grado di differenziazione, resistenza alla chemio e radioterapia.

Alcuni studi hanno mostrato dal 25 al 77% di CRC con overespressione di EGFR confermandosi come target per lo sviluppo di nuove terapie anticancro (15).

Il IMC-C225 (Cetuximab, *ImClone Systems*, New York, NY) è un anticorpo monoclonale anti EGFR.

Trials clinici su pazienti con CRC avanzato sono ancora in fase di studio ma incentiverebbero l'impiego di tale anticorpo in sinergia con altri chemioterapici in pazienti con documentata overespressione di EGFR (41).

Da ultimo il ZD1839 (Iressa, *Astra Zeneca*, London, UK) è anch'esso un inibitore tirosinchinasi-co di EGFR; la sua combinazione con protocolli di chemioterapia di tipo tradizionale in pazienti con CRC in stadio avanzato ha dato promettenti risultati su colture cellulari *in vitro* (35).

Questo nostro lavoro segue a quanto già pubblicato su questa rivista nel 1999 e ne rappresenta una evoluzione sia cognitiva che applicativa. Esso vuole altresì essere una ulteriore dimostrazione di come biologi, clinici e chirurghi debbano necessariamente formare équipes in grado di tradurre sul piano clinico quanto emerge dalle ricerche di base.

Bibliografia

1. Aaltonene LA, Salovaara R, Kristo P, et al: Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease *N Engl J Med* 1998; 338: 1481
2. Adjei AA, Erlichman C, Davis J et al.: A phase I trial of the farnesyl transferase inhibitor SCH66336: evidence for biologic and clinical activity. *Cancer Res* 2000; 6: 1871.
3. Allen JI: Colorectal cancer, *Molecular Biology in Cancer Medicine*. London, UK, Dunitz, 1999.
4. Alon T, Hemo I, Itin A, et al.: Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1995; 1: 1024.
5. Azumaya M, Kobayashi M, Ajioka Y, et al.: Size-dependent expression of cyclooxygenase-2 in sporadic colorectal adenomas relative to adenomas in patients with familial adenomatous polyposis. *Pathol Int.* 2002; 52: 282.
6. Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, et al.: Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature*, 1987; 328: 614.
7. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al.: Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 217.
8. Barbacid M: Ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987, 56: 779.
9. Bergsland E, Hurwitz H, Fehrenbacher L et al.: A randomized phase II trial comparing rhuMab VEGF (recombinant humanized monoclonal antibody to vascular endothelial cell growth factor) plus 5 fluorouracil/leucovorin (FU/LV) alone in patients with metastatic colorectal cancer (abstract) *A Soc Clin Oncol* 2000; 19: 242.
10. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR et al.: Prevalence of ras gene mutations in colorectal cancer. *Nature* 1987, 327: 293.
11. Bos JL: Ras oncogenes in human cancer; a review. *Cancer Res* 1989; 49: 4682.
12. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al.: A national Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 15: 5248.
13. Chen YQ, Hsieh JT, Yau F et al.: Induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest by DCC. *Oncogene* 1999; 29: 247.
14. Cho KR, Vogelstein B: Suppressor gene alterations in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *J Cell Biochem Suppl* 1992; 16: 137.
15. Ciardiello F, Tortora G: A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2958.
16. D'Emilia J., Bulovas K, D'Ercole D, et al.: Expression of c-erbB2 gene product (p-185) at different stages of neoplastic progression in the colon. *Oncogene* 1989; 4: 1233.
17. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M et al.: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hypermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146:1029.
18. Ellis LM, Takahashi Y, Liu W, et al.: Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: biology and therapeutic implications. *Oncologist* 2000; 1: 11.
19. Erismann MD, Scott JK, Watt RA, et al.: The c-myc protein is constitutively expressed at elevated levels in colorectal carcinomas lines. *Oncogene* 1988; 2: 367.
20. Fearhead NS, Britton MP, Bodmer WF: The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 721.

21. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759.
22. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM et al.: Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancer. *Science* 1990; 247: 49.
23. Feinberg AP, Gehrke CW, Kuo KC et al.: Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res* 1988; 48: 1159.
24. Forrester K, Almoguera C, Han K et al: Detection of high incidence of K-rs during human colon tumorigenesis. *Nature* 1987; 327: 298.
25. Giarnieri E, Consorti F, Midiri G et al.: Altered expression of hMSH2 in sporadic colorectal cancer, surrounding mucosa and at distant colonic mucosa. *Anticancer Res* 2000; 20, 3829.
26. Gille H, Kowalski J, Li B et al.: Analysis of biologic effects and signalling properties of Flt.1 (VEGFR) and KDR (VEGFR-2): a reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem* 2001; 276: 3222.
27. Gnanasampanthan G, Elsaleh, McCaul K., et al.: K-ras mutation type and survival benefit from adjuvant chemotherapy in Duke's C colorectal cancer. *J Pathol* 2001; 195: 543.
28. Guldenschuh I, Hurlimann R, Muller A, et al.: Relationship between APC genotype, polyp distribution, and oral sulindac treatment in the colon and rectum of patients with familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 1090.
29. Hao XP, Frayling IM, Sgouros JG, et al: The spectrum of p53 mutations in colorectal adenomas differs from that in colorectal carcinomas. *Gut* 2002; 50: 834.
30. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, et al: Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991; 253:661.
31. Jarvinen HJ, Mecklin JP, Sistonen P: Screening reduces colorectal cancer rate in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 1995; 108: 1405.
32. Lynch HT, Krush AJ: Cancer family "G" revisited: 1895-1970. *Cancer*, 1971; 27: 1505.
33. Lynch PM, Lynch HT, Harris RE: Hereditary proximal colonic cancer. *Dis Colon Rectum* 1977; 20: 661.
34. Lynch HT, Kimberling W, Albano WA et al.: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II). I Clinical description of resource. *Cancer* 1985; 15: 934.
35. Magne N, Fischel JL, Dubreil A, et al.: Influence of epidermal growth factor receptor (EGFR), p53 and intrinsic MAP kinase pathway status of tumour cells on the antiproliferative effect of ZD1839 ("Iressa"). *Br J Cancer* 2002; 86: 1518.
36. Midiri G, Tesoriere A, Giarnieri E, et al.: Fattori genetici e Cancro del colon-retto: una nuova frontiera per la sperimentazione clinica. *Giorn Chir* 1999; 20: 373.
37. Midiri G, Consorti F, Giarnieri E, et al.: In *Advances in molecular genetics and clinical implications of sporadic colorectal cancer*. In *Advances in abdominal surgery* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht The Netherlands 2002
38. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V et al.: Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997; 275: 1787.
39. Nakagawa H, J, Nuovo G, Zervos EE, et al.: Age-related hypermethylation of the 5' Region of MLH1 in normal colonic mucosa is associated with microsatellite-unstable colorectal cancer development. *Cancer Research* 2001; 61: 6991.
40. Nakamura Y, Lathrop M, Leppert M, et al: Localization of the genetic defect in familial adenomatous polyposis within a small region of chromosome 5Am J HumGenet 1988; 43: 638.
41. O'Dwyer PJ, Benson AB: 3rd Epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer. *Semin Oncol*. 2002; 5: 10.
42. Rosen P, Amdo R, Hecht JR et al.: A phase I/II study of SU416 in combination with 5-FU/leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer. *Am Soc Clin Oncol* 2000; 19: 3.
43. Samovitz WS, Curtin K, Ma KN, et al.: Prognostic significance of p53 mutations in colon cancer at the population level. *Int J Cancer* 2002; 99:597.
44. Scmutte C, Yang AS, Dung TT et al.: Mechanism for the involvement of DNA methylation in colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1996; 56: 23751.
45. Shibata D, Reale MA, Lavin P et al.: The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1996; 5: 1727.
46. Solomon E, Voss R, Hall V, et al.: Chromosome 5 allele loss in human colorectal cancer. *Nature* 1987; 328: 616.
47. Sturlan S, Kapitanovic S, Kovacevic D et al.: Loss of heterozygosity of APC and DCC tumor suppressor genes in human sporadic colon cancer. *J Mol Med* 1999; 77: 316.
48. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM et al: The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum*, 1991; 34:424.
49. Velcich A, Corner G, Palumbo L, et al: Altered phenotype of HT29 colonic adenocarcinoma cells following expression of the DCC gene. *Oncogene* 1999; 22:2599.
50. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, et al.: Allelotype of colorectal carcinomas; *Science* 1989; 244: 207.
51. Veronesi U: *Oncologia Chirurgica* ed Masson Milano, 1999.
52. Willmsen BM, Orris K, Papageorge AG et al: Harvey murine sarcoma virus p21 RAS protein biologic and biochemical significance of the cysteine nearest the carboxy terminus. *EMBO J* 1984; 3: 2581.
53. Zujewski J, Horak ID, Bol CJ, et al.: Phase I and pharmacokinetic study of farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in advanced cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 927.