

THE ROLE OF MISMATCH REPAIR PROTEINS EXPRESSION IN COLORECTAL CANCER

IL RUOLO DELL'ESPRESSIONE DELLE PROTEINE DEL MISMATCH REPAIR NELLA CANCEROGENESI COLORETTALE

Authors:

Bertolina Carlotta¹, Erra Stefania², Ranzato Elia¹

¹ DISIT UPO

² SC Anatomia Patologica ASL AL P.O. Casale Monferrato

Original article

Key words: Colorectal cancer, mismatch repair proteins, microsatellite instability

ABSTRACT

In the present study, carried out during the internship in Surgical Pathology of Santo Spirito Hospital in Casale Monferrato, a score based on the quantification of mismatch repair proteins (MMR) in patients with colorectal adenocarcinoma was devised, to determine whether a different expression in these proteins could correlate with some morphological parameters, and therefore whether it was possible to define a prognostic stratification for these patients.

OBJECTIVE

During this period, 73 cases of colorectal adenocarcinoma referred from 01/01/2020 to 31/03/2021 were analyzed. The cases were investigated by immunohistochemical examination to assess the expression of mismatch repair proteins. Subsequently, the immunohistochemical preparations were observed by light microscopy, evaluating a total percentage of expression in the tumor tissue, in order to perform a correlation study between the expression of mismatch repair proteins and some morphological characteristics of the tumor at diagnosis. The total expression of MLH1 protein, as representative of the MLH1/PMS2 heterodimer, and of MSH6 protein, as representative of the MSH2/MSH6 heterodimer, was quantified.

METHODOLOGY

Evaluation of microsatellite instability was obtained by immunohistochemical investigation using ROCHE's automated VENTANA BenchMark Ultra platform. Correlation study, between tumor morphological data at diagnosis and expression of mismatch repair proteins, was performed by use of parametric and nonparametric tests.

RESULTS

Total expression of MSH6 protein was higher than MLH1 expression in 60 of 73 cases. MSH6 protein is more frequently associated with high expression (from 75% to 100%) than MLH1, which is characterized by a lower expression range. The correlation test of MLH1 expression percentage with perineural invasion gave a statistically significant results, with a p-value below the limit of significance ($p=0.007191$). In the case of MSH6, statistically significant p-values were shown for tumor bud-

ding ($p=0.02577$), perineural invasion ($p=0.007498$) and growth margin ($p=0.04664$).

CONCLUSIONS

Quantifying MMR protein expression in MSS tumors could be a valuable aid in therapeutic choice, as well as in prognostic stratification of MSS patients between subjects with high expression, and thus less aggressive tumors, and subjects with low expression lesions of MLH1 and/or MSH6, and thus more biologically aggressive tumors. If a different expression in mismatch repair proteins correlates with morphological characteristics of greater or lesser malignancy, it could be hypothesized that patients with MSS colorectal cancer, treated with the same therapy, may have a greater or lesser response, depending on the percentage of expression of mismatch repair proteins, estimating a more effective adjuvant therapeutic response in subjects with high expression.

ABSTRACT

Nel presente studio, svolto durante il periodo di stage presso il Servizio di Anatomia Patologica del P.O. Santo Spirito di Casale Monferrato, è stato ideato uno score basato sulla quantificazione delle proteine del mismatch repair (MMR) nei pazienti con adenocarcinoma coloretale, per stabilire se una differente espressione in tali proteine possa correlare con determinati parametri morfologici, e quindi se fosse possibile definire una stratificazione prognostica per tali pazienti.

OBIETTIVO

Durante tale periodo sono stati analizzati 73 casi di adenocarcinoma coloretale refertati tra il 01/01/2020 ed il 31/03/2021. La casistica è stata indagata mediante esame immunohistochimico per valutare l'espressione delle proteine del mismatch repair. Successivamente, i preparati immunohistochimici sono stati osservati al microscopio ottico, valutandone una percentuale totale di espressione nel tessuto tumorale, in modo tale da poter effettuare uno studio di correlazione tra l'espressione delle proteine del mismatch repair ed alcune caratteristiche morfologiche del tumore alla diagnosi. Si è provveduto a quantificare l'espressione totale della proteina MLH1, come rappresentante dell'eterodimero MLH1/PMS2 e della proteina MSH6, come rappresentante dell'eterodimero MSH2/MSH6.

METODOLOGIA

La valutazione dell'instabilità dei microsatelliti è stata ottenuta tramite indagine immunohistochimica con utilizzo di piattaforma automatizzata VENTANA BenchMark Ultra di ROCHE. Lo studio di correlazione, tra i dati morfologici del tumore alla diagnosi e l'espressione delle proteine del mismatch repair, è stata effettuata mediante l'uso di test parametrici e non parametrici.

RISULTATI

L'espressione totale della proteina MSH6 è risultata superiore rispetto all'espressione di MLH1 in 60 casi su 73. La proteina MSH6 si associa più frequentemente ad un'espressione alta (dal 75% al 100%) rispetto ad MLH1, che si caratterizza per un range di espressione più basso. Il test di correlazione della percentuale di espressione di MLH1 con l'invasione perineurale ha dato un riscontro statisticamente significativo, con un valore p-value inferiore al limite di significatività ($p=0.007191$). Nel caso di MSH6 si evidenziano valori p-value statisticamente significativi per budding tumorale ($p=0.02577$), invasione perineurale ($p=0.007498$) e margine di crescita ($p=0.04664$).

CONCLUSIONI

Quantificare l'espressione delle proteine MMR nei tumori MSS potrebbe costituire un valido aiuto nella scelta terapeutica, oltre che nella stratificazione prognostica dei pazienti MSS tra soggetti con alta espressione, e quindi tumori meno aggressivi, e soggetti con lesioni a bassa espressione di MLH1 e/o MSH6, e quindi con neoplasie biologicamente più aggressive. Se una differente espressione nelle proteine del mismatch repair risultasse correlare con caratteristiche morfologiche di malignità più o meno maggiore, si potrebbe ipotizzare che pazienti con carcinoma coloretale MSS, trattati con la stessa terapia, possano avere una risposta maggiore o minore, in relazione alla percentuale di espressione delle proteine del mismatch repair, stimando una risposta terapeutica adiuvante più efficace nei soggetti con alta espressione.

INTRODUZIONE

L'adenocarcinoma coloretale è un tumore maggiormente diffuso in una popolazione di età compresa tra 60 e 75 anni, con poche distinzioni tra uomini e donne, mentre risulta raro prima dei 40 anni. Tale neoplasia rientra tra i primi cinque tumori più frequentemente diagnosticati in Italia; in particolare, corrisponde alla terza neoplasia come prevalenza nel sesso maschile e la seconda per quello femminile. Prendendo come riferimento la popolazione invece, il carcinoma coloretale è preceduto solo del tumore della mammella, che corrisponde ancora alla neoplasia più frequentemente diagnosticata (I numeri del cancro in Italia, 2020).

La maggior parte dei carcinomi coloretali (70-80%) sono sporadici ed originano da lesioni precancerose definite polipi. Una minoranza (20-30%) dei carcinomi coloretali si sviluppano come conseguenza di una sindrome di predisposizione genetica (Müller MF et al, 2016). La più comune forma ereditaria di tumore del colon-retto è rappresentata dalla sindrome di Lynch. Sindrome di predisposizione ereditaria meno frequente è la poliposi adenomatosa familiare. Un ulteriore gruppo, costituente l'1-2% della totalità dei casi, evolve come conseguenza di malattie infiammatorie croniche intestinali, come la malattia di Crohn e la rettocolite ulcerosa (Munkholm P. et al, 2003).

Gli eventi molecolari alla base dello sviluppo dell'adenocarcinoma coloretale sono estremamente variabili e racchiudono non solo anomalie genetiche ma anche epigenetiche. La carcinogenesi del colon-retto segue tre principali meccanismi: instabilità cromosomica che caratterizza la maggior parte dei tumori coloretali (CIN), modificazioni epigenetiche del DNA dovute a ipermetilazione delle isole CpG (CIMP) ed instabilità del sistema di riparazione dei mismatch del DNA (Tariq K, et al, 2016).

INSTABILITÀ DEI MICROSATELLITI

L'instabilità dei microsatelliti è causata da un difetto nel sistema di riparazione dei mismatch (MMR), che può verificarsi sia sporadicamente da alterazioni epigenetiche nel gene MLH1, che nel contesto della sindrome di Lynch, nota anche come carcinoma coloretale ereditario non poliposico (HNPCC), per inattivazione mutazionale di uno dei quattro geni MMR (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6). Come conseguenza, i mismatch che si verificano durante la replicazione del DNA non possono essere corretti e le mutazioni si accumulano in brevi tratti ripetitivi chiamati microsatelliti (Pfuderer PL et al, 2019). Queste sequenze di DNA, distribuite in tutto il genoma, per la loro caratteristica struttura ripetitiva, sono particolarmente soggette ad errori di replicazione.

In un sistema di riparazione integro ed efficiente, le proteine dei MMR identificano e correggono i mismatch del DNA causati dalla DNA polimerasi durante la replicazione, lavorando a coppie e formando rispettivamente i complessi MutL α

(MLH1 e PMS2) e MutS α (MSH2 ed MSH6). MutS α riconosce la singola coppia di base errata, crea un morsetto scorrevole intorno al DNA e lega il complesso MutL α . Questo sistema interagisce con molti enzimi, compresa l'esonucleasi 1 per eseguire l'escissione del singolo mismatch, e la DNA polimerasi per risintetizzare il filamento di DNA usando il filamento complementare come template (Fishel R. et al, 2015).

L'identificazione dell'instabilità dei microsatelliti risulta di fondamentale importanza nella diagnosi differenziale tra carcinomi coloretali sporadici e tumori del colon-retto con predisposizione ereditaria (Stjepanovic et al, 2019).

MATERIALI E METODI

Per questo studio sono stati raccolti ed analizzati 73 casi riguardanti reperti istologici di adenocarcinoma coloretale ottenuti in seguito a resezione del colon-retto.

La valutazione dell'instabilità dei microsatelliti e della mutazione di BRAF è stata ottenuta tramite indagine immunohistochimica con utilizzo di piattaforma automatizzata VENTANA BenchMark Ultra di ROCHE.

Lo studio di correlazione tra i dati morfologici del tumore alla diagnosi e l'espressione delle proteine del mismatch repair, quantificata dopo osservazione al microscopio ottico, è stata effettuata mediante tre diversi test, di cui due non parametrici: Wilcoxon, Welch t-test e Kruskal-Wallis.

RISULTATI

Dai casi analizzati si evidenzia che il sesso maschile risulta il più rappresentato, anche se si riporta un numero consistente di adenocarcinomi anche nel sesso femminile. Inoltre, dalla casistica risulta evidente una prevalenza verso il grado istologico G2, budding tumorale di alto grado, margine di crescita del tumore di tipo infiltrativo e sede di localizzazione a livello del tratto ascendente, seguito dal sigma/retto.

L'istotipo più frequentemente riscontrato è l'istotipo NAS; sono inoltre maggiormente rappresentati gli adenocarcinomi non metastatici rispetto a quelli con metastasi linfonodali o a distanza.

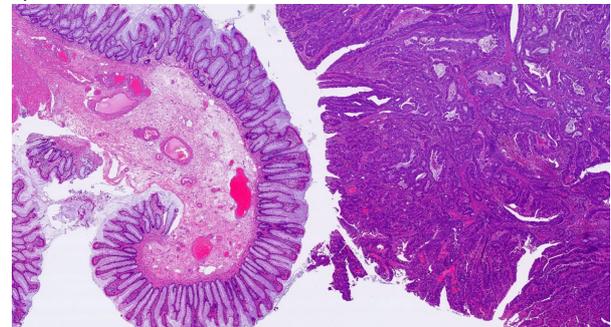


Immagine 1: adenocarcinoma coloretale di grado istologico G3, ingrandimento 2x, colorazione in EE.

L'analisi della valutazione dello status delle proteine dei mismatch repair, mediante metodica

immunoistochimica, ha evidenziato l'instabilità a livello dei microsattelliti, dovuta a delezione di una o più proteine del sistema di riparazione dei mismatch (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6), in 12 casi; nella quasi totalità dei suddetti casi l'instabilità è dovuta a delezione dell'eterodimero piuttosto che della singola proteina, con una prevalenza verso il dimer MHL1/PMS2. L'eccezione è rappresentata da un unico caso, in cui si rileva la delezione di MSH6 ma non di MSH2.

Anche la mutazione del gene BRAF è stata indagata con la metodica immunoistochimica e sono stati riportati 7 casi in cui si evidenzia la presenza della mutazione puntiforme V600E.

Mediante l'osservazione dei campioni istologici al microscopio ottico si è provveduto a quantificare l'espressione totale della proteina MLH1, come rappresentante dell'eterodimero MLH1/PMS2 e della proteina MSH6, come rappresentante dell'eterodimero MSH2/MSH6.

Sono state considerate positive, e quindi con espressione della proteina, le strutture ghiandolari tumorali che presentano pattern di colorazione in almeno il 50% della struttura ghiandolare.

L'espressione totale della proteina MLH1, e quindi del dimer MLH1/PMS2, risulta essere inferiore rispetto all'espressione della proteina MSH6, e quindi del dimer costituente MSH2/MSH6, nella maggior parte dei casi. Infatti, solo in 13 casi l'espressione della proteina MLH1 risulta superiore all'espressione della proteina MSH6.

- Sulla base di tali risultati è stato stabilito uno score quantitativo nella determinazione dell'espressione delle proteine del mismatch repair, suddividendo la percentuale di espressione di tali proteine esaminate rispettivamente come:
 - 0% per le proteine delete;
 - "bassa espressione" per i casi con positività inferiore al 50% del tumore;
 - "espressione moderata" per i casi con positività uguale o superiore al 50% ma inferiore al 75%;
 - "alta espressione" per i casi con positività in almeno il 75% delle cellule neoplastiche.

Lo studio di correlazione mediante i test parametrici e non parametrici precedentemente menzionati è stato effettuato utilizzando l'espressione della proteina MLH1, valutata mediante osservazione al microscopio ottico del campione, e correlandola con i seguenti dati morfologici: budding tumorale, grado, invasione vascolare, invasione perineurale, margine di crescita, metastasi e dimensione del tumore (stadiazione T).

La scelta dell'uno o dell'altro test utilizzato per i vari dati morfologici è dovuta alla distribuzione dei dati.

Il test Wilcoxon è stato utilizzato per analizzare una correlazione con le seguenti caratteristiche morfologiche: budding tumorale, invasione vascolare, invasione perineurale e margine di crescita. Il valore p-value per il budding tumorale è 0.3973, con una mediana di 0.65 per il budding di basso grado ed una mediana di 0.55 per quello di alto grado.

Il valore p-value per l'invasione vascolare è 0.9823, con una mediana di 0.65 per i casi senza

invasione ed una mediana di 0.45 nei casi in cui è presente l'invasione vascolare.

Il valore p-value per l'invasione perineurale con il medesimo test è 0.007191, con una mediana di 0.65 nei casi in cui è assente l'invasione ed una mediana di 0.45 per i casi con invasione presente. Il valore p-value risulta significativo in quanto è inferiore a 0.05 ed in questo caso un'alta espressione di MLH1 si associa ad adenocarcinomi senza invasione perineurale.

Il valore p-value per il margine di crescita è 0.8776, con una mediana di 0.55 sia per i casi a crescita espansiva sia per quelli a crescita infiltrativa.

Il t-test Welch è stato utilizzato per correlare: il grado tumorale e le metastasi.

Il valore p-value per il grado tumorale è 0.3511, con un valore della variabile G2 di 0.539 ed un valore di 0.465 per la variabile G3.

Il valore p-value per le metastasi è 0.5672, con un valore di 0.472 per gli adenocarcinomi metastatici ed un valore di 0.514 per quelli non metastatici. Il test Kruskal-Wallis è stato utilizzato per correlare i dati riferiti alla dimensione del tumore.

Il valore p-value per T è 0.7256, con un valore di 0.80 per T1, 0.60 per T2, 0.55 per T3 e 0.60 per T4.

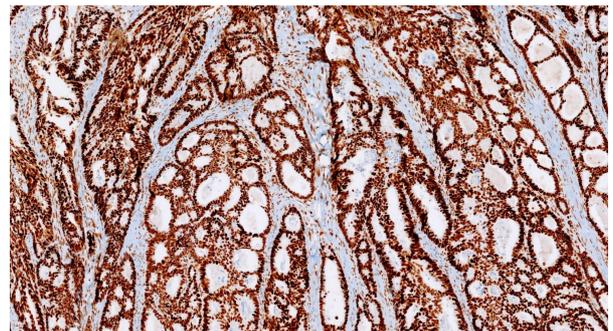


Immagine 2: espressione della proteina MSH6 quantificata al 100%, ingrandimento 10x.

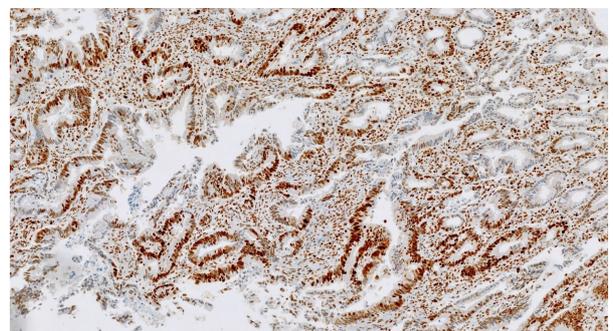


Immagine 3: espressione della proteina MSH6 quantificata al 55%, ingrandimento 10x.

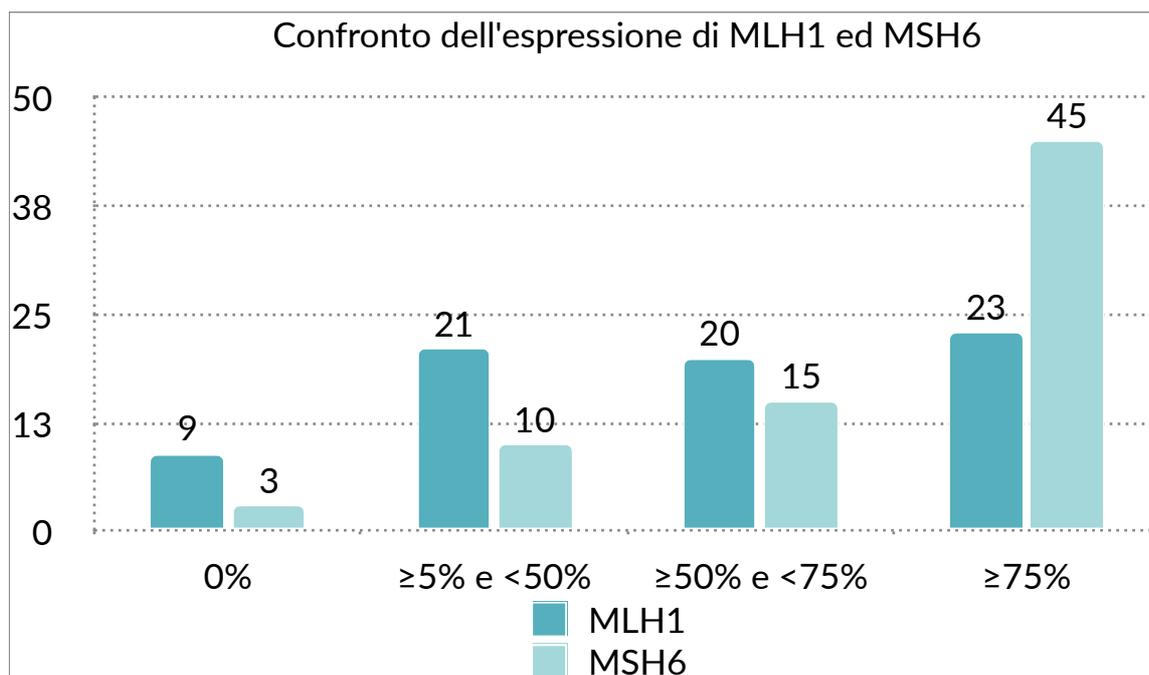


Grafico 1: la proteina MSH6 si associa più frequentemente ad un'espressione alta (dal 75% al 100%) rispetto ad MLH1, mentre la proteina MLH1 si distribuisce in maniera più uniforme tra i vari scores ed è più rappresentata, rispetto ad MSH6, agli scores a bassa o moderata espressione (dal 5% al 75%).

Dato morfologico	Tipo di test	p-value	parametri
Budding	Wilcoxon	0.3973	Basso = 0.65 Alto = 0.55
Grado	Welch t-test	0.3511	G2 = 0.5391837 G3 = 0.4652174
Invasione vascolare	Wilcoxon	0.9823	No = 0.60 Si = 0.55
Invasione perineurale	Wilcoxon	0.007191	Assente = 0.65 Presente = 0.45
Margine di crescita	Wilcoxon	0.8776	Esp = 0.55 Inf = 0.55
Metastasi	Welch t-test	0.5672	Si = 0.4722222 No = 0.5144186
Dimensione del tumore (T)	Kruskal-Wallis	0.7256	T1 = 0.80 T2 = 0.60 T3 = 0.55 T4 = 0.60

Tabella 1: risultati dei test di correlazione per MLH1.

Lo stesso studio di correlazione precedentemente esposto è stato effettuato per l'espressione della proteina MSH6, correlandola con i medesimi dati morfologici utilizzati per la proteina MLH1.

Il test Wilcoxon è stato utilizzato per valutare la correlazione con le seguenti caratteristiche morfologiche: budding tumorale, invasione vascolare ed invasione perineurale.

Il valore p-value per il budding tumorale è 0.02577, con una mediana di 0.9 per il budding di basso grado ed una mediana di 0.75 per quello di alto grado. Il valore p-value risulta significativo ed il risultato del test denota che un'alta espressione della proteina MSH6 si associa ad un budding di basso grado.

Il valore p-value per l'invasione vascolare è 0.07069, con una mediana di 0.85 per i casi senza invasione ed una mediana di 0.70 nei casi in cui è presente l'invasione vascolare. Il valore è molto vicino al livello di significatività, ma resta comunque superiore a 0.05.

Il valore p-value per l'invasione perineurale con il medesimo test è 0.007498, con una mediana di 0.85 nei casi in cui è assente l'invasione ed una

mediana di 0.65 per i casi con invasione presente. Il valore p-value risulta significativo in quanto è inferiore a 0.05 ed un'alta espressione di MSH6 si associa a tumori senza invasione perineurale.

Il t-test Welch è stato utilizzato per correlare: grado tumorale, margine di crescita e metastasi.

Il valore p-value per il grado è 0.2156, con un valore della variabile G2 di 0.752 ed un valore di 0.660 per la variabile G3.

Il valore p-value per il margine di crescita è 0.04664, con un valore di 0.7939 per i casi con crescita infiltrativa ed un valore di 0.8676 per quelli a crescita espansiva. Il valore p-value è inferiore a 0.05 e risulta significativo; infatti, denota l'associazione di una più alta espressione della proteina MSH6 con tumori che presentano un margine di crescita espansivo.

Il valore p-value per le metastasi è 0.6576, con un valore di 0.565 per gli adenocarcinomi metastatici ed un valore di 0.596 per quelli non metastatici.

Il test Kruskal-Wallis è stato utilizzato per correlare i dati riferiti alla dimensione del tumore.

Il valore p-value per T è 0.643, con un valore di 0.95 per T1 e 0.80 per T2, T3 e T4.

Dato morfologico	Tipo di test	p-value	parametri
Budding	Wilcoxon	0.02577	Basso = 0.9 Alto = 0.75
Grado	Welch t-test	0.2156	G2 = 0.7522449 G3 = 0.6600000
Invasione vascolare	Wilcoxon	0.07069	No = 0.85 Si = 0.70
Invasione perineurale	Wilcoxon	0.007498	Assente = 0.85 Presente = 0.65
Margine di crescita	Welch t-test	0.04664	Inf = 0.7939371 Esp = 0.8676353
Metastasi	Welch t-test	0.6576	Si = 0.5655148 No = 0.5963116
Dimensione del tumore (T)	Kruskal-Wallis	0.643	T1 = 0.95 T2 = 0.80 T3 = 0.80 T4 = 0.80

Tabella 2: risultati dei test di correlazione per MSH6.

CONCLUSIONI

Il carcinoma coloretale rappresenta uno dei principali problemi di salute nei Paesi occidentali, rappresentando il terzo tumore maligno più comune-

mente diagnosticato negli uomini ed il secondo nelle donne (Jemal A. et al, 2011).

La valutazione dell'instabilità dei microsatelliti è essenziale non solo nel contesto genetico, e quindi come strumento di screening per rilevare la sindrome di Lynch, ma può avere anche un importan-

te valore prognostico e predittivo di risposta alla chemioterapia ed all'immunoterapia (Chang L. et al, 2017).

Attualmente, la valutazione IHC dello status delle proteine del MMR viene espressa come negativa (per indicarne la delezione) o positiva (per definirne la presenza), come da linee guida internazionali pubblicate dal CAP nel 2012. Una proteina espressa tuttavia, può essere definita come tale al test anche quando si evidenzia una colorazione limitata ad un campo ristretto del tessuto tumorale e quindi lo status di positività delle proteine MMR può riflettere una grande eterogeneità tra i vari campioni.

Partendo da questa considerazione, il presente studio si è posto l'obiettivo di valutare la possibilità di definire livelli differenti di espressione delle proteine del MMR, valutando se un'espressione quantitativamente più o meno elevata della proteina possa correlare con determinati parametri morfologici del tumore.

A questo scopo, si è stabilito uno score quantitativo nella determinazione dell'espressione delle proteine del mismatch repair, definendo "bassa espressione" i casi con positività inferiore al 50% del tumore, "espressione moderata" una positività uguale o superiore al 50% ma inferiore al 75% ed "alta espressione" una positività in almeno il 75% delle cellule neoplastiche.

Dalla ricerca in letteratura, al fine di stabilire un possibile ruolo di MSH6 considerati i risultati maggiormente significativi per tale proteina, è emerso uno studio del 2018 il quale ha valutato la correlazione tra i livelli di espressione delle proteine MMR e l'espressione di ATR (ataxia teleangectasia e Rad-3 related) nel meccanismo di regolazione del ciclo cellulare mediato dal pathway ATR-Chk1 (Checkpoint kinase1), su cultura primaria di cellule umane di tumore ipofisario. Da tale studio è emersa una correlazione positiva delle proteine MSH6 ed MSH2 in relazione al tempo di raddoppio del volume tumorale, suggerendo che una riduzione dell'espressione di MSH6 ed MSH2 promuove la crescita del tumore ipofisario andando a ridurre la regolazione cellulare mediata da ATR-Chk1, per

riduzione dell'espressione del gene ATR, stimolando la progressione del ciclo cellulare e diminuendo l'apoptosi in questi tipi di tumori (Uraki S. et al, 2018).

Se una riduzione di queste proteine portano ad un deficit della funzione della via ATR-Chk1, e quindi al mancato blocco delle cellule con danni al DNA, le quali avanzeranno nel ciclo cellulare proliferando, sono giustificabili i risultati di correlazione positiva tra l'espressione della proteina MSH6 con caratteri morfologici di minor malignità ed aggressività, in quanto un'espressione maggiore della proteina MSH6 si tradurrebbe in un'attivazione dei checkpoints di fase G2 impedendo la proliferazione cellulare di cellule con danno ad DNA.

Se quindi è vero che l'identificazione dell'instabilità dei microsatelliti è utile al fine di improntare la migliore strategia terapeutica verso questi pazienti, quantificare anche l'espressione delle proteine MMR nei tumori MSS potrebbe costituire un valido aiuto nella scelta terapeutica, oltre che nella stratificazione prognostica dei pazienti MSS tra soggetti con alta espressione, e quindi tumori meno aggressivi, e soggetti con lesioni a bassa espressione di MLH1 e/o MSH6, e quindi con neoplasie biologicamente più aggressive.

Inoltre, se una differente espressione nelle proteine del mismatch repair risulta correlare con caratteristiche morfologiche di malignità più o meno maggiore, si potrebbe ipotizzare che pazienti con carcinoma coloretale MSS, trattati con la stessa terapia, possano avere una risposta maggiore o minore, in relazione alla percentuale di espressione delle proteine del mismatch repair, stimando una risposta terapeutica adiuvante più efficace nei soggetti con alta espressione.

Questo approccio prognostico di natura morfologica, se adattato su ampia scala da più centri di anatomia patologica, potrebbe essere utilizzato per una stratificazione prognostica oggettiva dei tumori coloretali non instabili, consentendo la sperimentazione dell'efficacia dell'immunoterapia in quelle lesioni "borderline" individuabili con le neoplasie con bassa espressione delle proteine del mismatch repair.

Bibliografia

1. Chang L, Chang M, Chang HM, Chang F. Expanding Role of Microsatellite Instability in Diagnosis and Treatment of Colorectal Cancers. *J Gastrointest Cancer*. 2017 Dec;48(4):305-313. doi: 10.1007/s12029-017-9991-0. PMID: 28699072; PMCID: PMC5660134
2. Fishel R. Mismatch repair. *J Biol Chem*. 2015 Oct 30;290(44):26395-403. doi: 10.1074/jbc.R115.660142. Epub 2015 Sep 9. PMID: 26354434; PMCID: PMC4646297
3. I numeri del cancro in Italia 2020, Intermedia Editore
4. Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E. and Forman, D. (2011), Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61: 69-90. doi: 10.3322/caac.20107
5. Müller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2016 Aug;469(2):125-34. doi: 10.1007/s00428-016-1956-3. Epub 2016 Jun 20. PMID: 27325016; PMCID: PMC4978761
6. Munkholm P. Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003 Sep;18 Suppl 2:1-5. doi: 10.1046/j.1365-2036.18.s2.2.x. PMID: 12950413

7. Pfuderer PL, Ballhausen A, Seidler F, Stark HJ, Grabe N, Frayling IM, Ager A, von Knebel Doeberitz M, Kloor M, Ahadova A. High endothelial venules are associated with microsatellite instability, hereditary background and immune evasion in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2019 Aug;121(5):395-404. doi: 10.1038/s41416-019-0514-6. Epub 2019 Jul 30. PMID: 31358939; PMCID: PMC6738093
8. Stjepanovic N, Moreira L, Carneiro F, Balaguer F, Cervantes A, Balmaña J, Martinelli E; ESMO Guidelines Committee. Hereditary gastrointestinal cancers: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2019 Oct 1;30(10):1558-1571. doi: 10.1093/annonc/mdz233. PMID: 31378807
9. Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med*. 2016 Mar;13(1):120-35. doi: 10.28092/j.issn.2095-3941.2015.0103. PMID: 27144067; PMCID: PMC4850121
10. Uraki S, Ariyasu H, Doi A, Kawai S, Takeshima K, Morita S, Fukai J, Fujita K, Furuta H, Nishi M, Sugano K, Inoshita N, Nakao N, Yamada S, Akamizu T. Reduced Expression of Mismatch Repair Genes MSH6/MSH2 Directly Promotes Pituitary Tumor Growth via the ATR-Chk1 Pathway. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018 Mar 1;103(3):1171-1179. doi: 10.1210/jc.2017-02332. PMID: 29342268