

## INDICE

<b>RIASSUNTO</b> .....	3
 <b>CAPITOLO 1. IL TUMORE DEL COLON-RETTO: GENERALITA'</b> .....	 4
1.1 Epidemiologia.....	4
1.2 Eziologia:.....	5
- a fattori ambientali.....	5
- b fattori genetici.....	7
1.3 Screening.....	11
1.4 Cenni di anatomia patologica.....	14
1.5 Quadro clinico, modalità di diffusione ed esami diagnostici.....	18
1.6 Stadiazione.....	20
1.7 Il trattamento della malattia localizzata:.....	25
- a cenni di terapia chirurgica.....	25
- b cenni di chemioterapia adiuvante.....	27
 <b>CAPITOLO 2. IL TRATTAMENTO DELLA MALATTIA METASTATICA</b> .....	 34
2.1 Il ruolo della terapia chirurgica:.....	34
- a il concetto di reseccabilità.....	34
- b tecniche chirurgiche sulle metastasi epatiche.....	36
2.2 Il ruolo della terapia medica:.....	38
- a pazienti con metastasi reseccabili.....	38
- b pazienti con metastasi marginalmente o potenzialmente reseccabili.....	39
- c pazienti con metastasi non reseccabili.....	42
 <b>CAPITOLO 3. IL RUOLO DELLA CARATTERIZZAZIONE BIOMOLECOLARE</b> .....	 46
3.1 <i>KRAS</i> e <i>BRAF</i> : cenni di biologia molecolare.....	46
3.2 La mutazione di <i>KRAS</i> : aspetti clinici.....	49
3.3 La mutazione di <i>BRAF</i> : aspetti clinici.....	52

<b>CAPITOLO 4. IL RUOLO DELLE MUTAZIONI DI <i>KRAS</i> E <i>BRAF</i> NELLA PROGNOSI DEI PAZIENTI AFFETTI DA CARCINOMA COLORETTALE CON METASTASI EPATICHE RESECATE .....</b>	<b>55</b>
4.1 Introduzione e razionale.....	55
4.2 Disegno, materiali e metodologia.....	58
4.3 Risultati.....	60
4.4 Discussione e conclusioni.....	63
4.5 Tabelle e figure.....	66
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>77</b>

## Riassunto

Il trattamento del carcinoma coloretale metastatico si è rapidamente evoluto negli ultimi 10 anni. I progressi maggiori sono stati resi possibili dall'introduzione di farmaci biologici, l'identificazione di specifici markers biomolecolari prognostici e predittivi, il progressivo miglioramento delle tecniche chirurgiche di resezione delle metastasi epatiche e quindi, quale naturale conseguenza, l'espandersi delle indicazioni per questo tipo di chirurgia.

Nonostante notevoli e incessanti progressi, la caratterizzazione prognostica dei pazienti e la definizione di specifiche indicazioni terapeutiche sulla base di fattori biomolecolari può dirsi ancora agli albori e certamente rappresenta tuttora una delle più attuali sfide dell'oncologia moderna. Il setting dei pazienti affetti da carcinoma coloretale metastatico candidati a resezione delle metastasi epatiche con intento curativo è stato fin ad oggi ben poco esplorato dal punto di vista biomolecolare. I criteri attuali di selezione dei pazienti che possano beneficiare in misura clinicamente rilevante di un intervento di resezione di metastasi epatiche sono esclusivamente clinici. Molti score prognostici sono stati elaborati, proposti e variamente testati per poter definire specifiche classi di rischio di recidiva. Purtroppo ad oggi, pur conoscendosi molti fattori condizionanti un alto rischio di recidiva e, quindi, ridotte possibilità di sopravvivenza a lungo termine non esistono determinanti specifici in grado di definire in maniera assoluta quali pazienti debbano essere sottoposti a resezione epatica e quali definitivamente esclusi. Muovendo da un consistente background clinico e biologico diversi gruppi di ricerca in varie parti del mondo hanno ipotizzato che un aiuto consistente nella definizione di nuove categorie di rischio possa venire dallo studio di specifiche alterazioni biomolecolari. Tra queste in particolare, le mutazioni di oncogeni ampiamente studiati e di storica importanza nella cancerogenesi coloretale quali *KRAS* e *BRAF*.

In questo elaborato vi è un'estesa revisione della letteratura sull'argomento e sono presentati nel dettaglio i risultati di un ampio studio retrospettivo che ha indagato il possibile ruolo delle mutazioni dei geni *KRAS* e *BRAF* nel definire un sottogruppo di pazienti con carcinoma coloretale metastatico clinicamente candidati a resezione epatica potenzialmente curativa con minime possibilità di guarigione o di sopravvivenza libera da ricaduta.

# Capitolo 1. Il tumore del colon retto: generalità

## 1.1 EPIDEMIOLOGIA

Il tumore del colon-retto presenta un notevole impatto mondiale, illustrato da dati epidemiologici assai significativi; con un'incidenza superiore a 1,2 milioni di nuovi casi anno e 60.000 decessi annui su scala mondiale<sup>1</sup>, rappresenta ben l'8% di tutte le diagnosi di neoplasia in età adulta, con 300.000 nuovi casi e 140.000 decessi complessivi.

Negli USA è il 3° tumore per incidenza sia per l'uomo che per la donna<sup>2</sup>, in Europa è al 2° posto per la donna, 3° posto per l'uomo sempre per incidenza ma anche per mortalità. Per esattezza il tumore del colon ha un'incidenza simile tra i due sessi mentre il tumore del retto risulta leggermente più frequente nell'uomo. Nei Paesi a maggior rischio è stato stimato che, nell'ambito della popolazione generale un uomo abbia la probabilità di ammalarsi di tumore del colon-retto del 4,5% nel corso della propria vita e in una donna tale probabilità sia del 3,2%.<sup>3</sup>

In Italia attualmente sono circa 37.500 nuovi casi/anno (a confronto con i 16.000 casi del 1970); tale aumento di incidenza è prevalentemente riferibile all'incremento percentuale della popolazione anziana correlato alla maggior aspettativa di vita. Il rischio si manifesta a partire dai 40 anni e aumenta esponenzialmente nelle decadi successive<sup>4</sup>; circa il 70% dei tumori del colon e i due terzi dei tumori del retto si presenta in pazienti con più di 65 anni.

L'età mediana di insorgenza del tumore è infatti di 70 anni e l'incidenza è direttamente proporzionale all'avanzare dell'età ( per il tumore del colon incidenza di 2 per 100.000/anno al di sotto di 45 anni, 120 per 100.000 tra i 65 e i 74anni e 200 per 100.000 oltre i 75; per il tumore del retto l'incidenza al di sotto dei 45 anni è di 1,3 per 100.000/anno e tra 65 e 70 anni è di 73 per 100.000).

Nei Paesi industrializzati l'incidenza di questa neoplasia è 2 volte superiore rispetto ai paesi in via di sviluppo anche se è stata registrata un'inversione di tendenza a partire dagli anni '50 ovvero un graduale aumento di incidenza del tumore nei Paesi a "basso rischio" ed una riduzione o stabilizzazione di incidenza nei Paesi ad alto rischio<sup>5,6</sup>. Altamente suggestivo del notevole impatto di fattori ambientali sull'insorgenza del carcinoma colon-rettale (CRC) è la dimostrazione che le popolazioni immigrate acquisiscono il rischio del Paese di residenza entro una generazione. Tale fenomeno sottolinea infatti l'importanza di abitudini di vita e stili alimentari (inevitabilmente diversi in differenti contesti culturali) sulla eziopatogenesi del CRC. Nel Nord del mondo (aree

ad alto rischio di CRC come Australia, Giappone, Nord America ed Europa Occidentale) si registrano ben 400.000 casi ogni anno e l'accentuata discrepanza nella incidenza di neoplasia colon-rettale con i Paesi in via di sviluppo ( a basso rischio) si ritiene in parte dovuta proprio a diverse culture alimentari e di vita, associate chiaramente a diverse potenzialità e diffusione dei programmi di screening e diagnosi. La malattia è prevalentemente localizzata a livello del colon terminale e nel retto (55% dei casi) a seguire cieco e colon ascendente (25% dei casi), 11% colon trasverso e flessura splenica ed infine 9% colon discendente.

Nonostante l'elevata incidenza di malattia, la mortalità è relativamente bassa con una sopravvivenza globale a 5 anni del 60%. Negli ultimi decenni si è infatti osservato un aumento della sopravvivenza a 5 anni del 9% nel carcinoma del colon e del 7% nel carcinoma del retto, aumento legato alla diagnosi precoce (programmi di screening e maggior uso di esami endoscopici) e ai miglioramenti terapeutici (soprattutto nel trattamento adiuvante e delle metastasi). (vedi dettagli in "stadiazione")

La sopravvivenza risulta superiore nei giovani rispetto ai più anziani. L'aumento di sopravvivenza determina una elevata prevalenza di malattia che è stimabile ad oltre 2 milioni di persone nel mondo e 660.000 casi in Europa.<sup>7</sup>

## *1.2 EZIOLOGIA*

### *1.2a Fattori ambientali*

Nel determinismo del cancro colon-rettale –su un pattern di suscettibilità genetica propria di ogni individuo- agiscono fattori genericamente denominati ambientali, i quali sono intimamente correlati con il processo di cancerogenesi. Tale asserzione è giustificata dalla notevole variabilità di incidenza riscontrata nelle varie aree geografiche ed etnie, dagli studi di migrazione e dalle diversità degli indici epidemiologici tra le varie nazioni; l'importanza degli stili alimentari è stata poi confermata da numerosi studi.

Particolarmente rilevante risulta essere la correlazione tra introito calorico, sedentarietà, obesità e cancro colon-rettale;<sup>8</sup> a supporto di ciò è stato infatti stimato che ben il 70% dei carcinomi colon-rettali potrebbe essere prevenuto da un intervento dietetico adeguato. In ulteriori studi prospettici sono stati identificati diversi fattori promuoventi tra cui uno dei principali risulta essere il consumo elevato di carni rosse e grassi di origine animale, forte determinante di un aumentato rischio; questo sarebbe da ricondurre ,in parte, all'effetto citotossico e promuovente la proliferazione cellulare della mucosa, esercitato dall'eme di origine dietetica.

Sulla base degli studi epidemiologici è stato inoltre ipotizzato che il consumo di grassi

animali e quindi di colesterolo, stimoli la secrezione di acidi biliari i quali a loro volta verrebbero convertiti dalla flora batterica intestinale in agenti cancerogeni o promotori di cancerogenesi.<sup>9</sup> Una dieta ricca in carne rossa sembra essere associata ad un rischio relativo di circa 2, rischio che raddoppia se la carne è ben cotta (la cottura prolungata determina la formazione di amine eterocicliche, noti agenti cancerogeni) o fritta; aumentato rischio neoplastico anche per diete ricche in grassi e proteine con una modesta componente di carboidrati non raffinati, come dimostrato dalla maggiore frequenza di sviluppo di foci neoplastici nella mucosa colica di ratti sottoposti a regimi dietetici ad elevato potenziale energetico.<sup>10</sup>

Un elevato apporto di fibre appare essere associato a bassa incidenza di carcinoma colon-rettale; infatti le fibre alimentari sembrano interferire nella eziopatogenesi del cancro con diversi meccanismi: legame agli acidi biliari, inibizione della formazione di nitrosamine, aumento del contenuto liquido delle feci, diluizione dei carcinogeni, riduzione del tempo di transito intestinale e quindi di contatto del cancerogeno con mucosa colica.<sup>11,12</sup> Importante anche il potere anti-ossidante di vitamine contenute in frutta e verdura, capace di rimuovere le specie reattive dell'ossigeno.

Inoltre le fibre hanno dimostrato –agendo da substrato per la fermentazione della flora batterica- di indurre la formazione di catene corte di acidi grassi dotate di un potere anti-cancerogeno in vitro.

Una recente metanalisi condotta su 31 studi indica una significativa correlazione tra il “body mass index” (BMI, indice di massa corporea) e il rischio di sviluppare cancro colon-rettale, con un rischio relativo di sviluppare neoplasia di 1,19 nel gruppo con BMI superiore a 30 kg/m<sup>2</sup> rispetto ai normopeso; esiste inoltre una diretta proporzionalità tra l'incremento del peso, la circonferenza corporea ed il rischio di CRC.<sup>13</sup> Presumibilmente l'obesità interferisce con la cancerogenesi tramite il meccanismo dell'insulino-resistenza, con conseguenti alti livelli di insulina, acidi grassi e trigliceridi plasmatici, coinvolti a lungo termine nella promozione neoplastica.<sup>14</sup>

Infine calcio e acido folico mostrano avere un effetto protettivo, mentre l'elevato consumo di alcol potrebbe rappresentare un fattore di rischio.

Indubbio è il ruolo favorente del fumo di sigaretta sulla patogenesi del CRC ed il rischio è strettamente correlato all'entità dell'esposizione; al di sopra di 20 pacchetti/anno aumenta il rischio di polipi adenomatosi mentre 30 pacchetti/annui sono associati ad aumentato rischio di carcinoma.<sup>15</sup>

Condizioni predisponenti lo sviluppo di carcinoma colon-rettale includono le malattie infiammatorie croniche intestinali,<sup>16,17</sup> in particolare la colite ulcerosa che comporta un

rischio crescente con la durata e l'estensione di malattia; la prevalenza di CRC in paziente con rettocolite ulcerosa è del 3,7% e sale al 5,4% per coloro che hanno un più esteso coinvolgimento intestinale (pancolite).<sup>18</sup> Rischio aumentato soprattutto nei casi di insorgenza precoce di malattia, interessamento di ileo terminale, associazione con colangite sclerosante primitiva ed infine severo grado di flogosi in presenza di aree displastiche.<sup>19</sup> Ruolo meno certo sembrerebbe svolto dal Morbo di Crohn, nonostante l'associazione con l'aumentata prevalenza di adenocarcinomi del piccolo intestino;<sup>19</sup> tuttavia la significatività statistica potrebbe essere raggiunta considerando malattie di lunga durata ed elevata estensione.

Un numero elevato di studi ha evidenziato una riduzione del rischio di cancro colon-rettale con l'uso di acido acetilsalicilico (meglio noto come aspirina, appartenente alla famiglia dei FANS, farmaci anti-infiammatori non steroidei) ipotizzandone un ruolo preventivo; la maggior evidenza epidemiologica deriva da uno studio condotto su un campione di 47.000 uomini in terapia cronica con aspirina che ha fatto registrare una riduzione globale di casi di cancro colon-rettale del 30% ed una riduzione delle forme invasive del 50%. L'aspirina riduce inoltre il rischio di recidiva di adenomi in pazienti con pregressi carcinomi o adenomi colon-rettali.

Il meccanismo di chemioprevenzione dei FANS è fondato sull'inibizione di COX2 (ciclossigenasi-2), enzima coinvolto nella regolazione di angiogenesi, apoptosi e fortemente espresso dall'epitelio neoplastico.<sup>20</sup> L'importanza della flogosi sulla cancerogenesi è infine dimostrata dal fatto che elevati livelli plasmatici di Proteina C Reattiva –noto mediatore di infiammazione- si associano ad un aumentato rischio di CRC.<sup>21</sup>

Ancora controversi appaiono i dati sulla correlazione tra irradiazione pelvica a scopo terapeutico e sviluppo di CRC; uno studio prospettico condotto su 246 pazienti trattati con radioterapia esterna per carcinoma prostatico mostra un effettivo aumento del rischio di sviluppare tumori colici, ma non rettali, rispetto alla popolazione generale.<sup>22</sup> È tuttavia ipotizzabile ed auspicabile che, qualunque sia il contributo di questo fattore, il rischio vada riducendosi grazie all'adozione sempre più ampia di tecniche conformazionali di irradiazione pelvica.

### ***1.2b Fattori genetici***

La maggior parte dei tumori del colon-retto è riferibile a fattori ambientali o più esattamente ad interazione fra ambiente e background genetico; tuttavia esiste un piccolo sottogruppo -5-10% dei pazienti- dove ad essere prevalenti sono i fattori genetici; è

comunque doveroso ricordare che anche nei casi sporadici (70-80%) è nota la presenza di instabilità cromosomica, squilibrio allelico e aberrazioni cromosomiche come amplificazioni, delezioni e traslocazioni che nell'insieme contribuiscono all'aneuploidia del tumore.<sup>23-26</sup> Nel restante 20-30% dei casi, si ritiene che il CRC possa insorgere in pazienti che presentano una predisposizione ereditaria a questo tipo di neoplasia. Alla base di questa maggiore suscettibilità sembrano risiedere genotipi a bassa penetranza caratterizzati da mutazioni frame-shift, sostituzioni di basi, localizzate soprattutto a livello di brevi sequenze nucleotidiche ripetute in tandem (microsatelliti),<sup>27,28</sup> e numerosi polimorfismi localizzati a livello di geni codificanti prodotti che partecipano a processi chiave dell'omeostasi cellulare.<sup>29</sup>

I geni coinvolti nel processo mutazionale sono suddivisibili in 3 principali gruppi:

- proto-oncogeni: geni coinvolti nel processo di proliferazione cellulare in quanto codificanti per recettori di fattori di crescita (c-SYS, c-ERB-B/neu, c-ERB-A), fattori di trascrizione nucleare (c-MYC, c-FOS, c-JUN) e proteina traduttrici del segnale di crescita (c-RAS, c-ABL)
- anti-oncogeni o oncosoppressori : geni come p53, APC, DCC, MCC che modulano in senso negativo la proliferazione cellulare, favorendone piuttosto la differenziazione
- geni coinvolti nella riparazione di errori di replicazione del DNA (Mismatch Repair genes, MMR genes), i quali subiscono silenziamento epigenetico<sup>30,31</sup> (vedi “cancerogenesi multi-step”).

Ulteriori condizioni che possono promuovere lo sviluppo neoplastico risiedono in alterazioni del metabolismo di sostanze cancerogene tra cui idrocarburi policiclici aromatici (ad esempio: glutatione-S-transferasi, citocromi P450) e amine eterocicliche, che se non adeguatamente smaltite facilitano la trasformazione cancerogena.

Due metanalisi di studi osservazionali hanno inoltre dimostrato un rischio relativo di 2.25 in individui con un solo parente di primo grado affetto da tumore del colonretto, a fronte di un rischio relativo di 4-4.25 in coloro con più di un parente di primo grado affetto da CRC o con un familiare che sviluppa la neoplasia prima di 45 anni,<sup>32,33</sup> rispetto alla popolazione generale.

Riconosciamo 2 principali forme di cancro ereditario, caratterizzate da un rischio drammaticamente aumentato di sviluppare CRC, a causa di mutazioni genetiche ad alta



penetranza.<sup>34</sup> Tali sindromi familiari sono ben definite dal punto di vista clinico e mutazionale e si differenziano per la presenza o meno di poliposi intestinale in:

- FAP (poliposi adenomatosa familiare) e le sue varianti quali la Sindrome di Gardner, la Sindrome di Turcot e la FAP attenuata.<sup>35</sup>
- Sindrome di Lynch o HNPCC (carcinoma colon-rettale ereditario non associato a poliposi).<sup>36</sup>

Gli studi effettuati sulle forme di cancro ereditario hanno evidenziato una serie di alterazioni genetiche sulle cellule germinali che si è visto ripresentarsi anche su cellule somatiche, portando poi allo sviluppo di un cancro sporadico; da ciò si intuisce l'importanza che le forme ereditarie hanno avuto per la comprensione della cancerogenesi anche nel cancro sporadico.

La FAP (poliposi adenomatosa familiare)<sup>35</sup> è responsabile dell'1% dei tumori del colon; è caratterizzata da un'ereditarietà di tipo autosomico dominante, ad elevata penetranza ed è dovuta ad una comune alterazione a carico del gene APC (Adenomatous Polyposis Coli), localizzato in 5q21, che comporta una iperespressione dell'oncogene  $\beta$ -catenina e quindi un'induzione indiretta di proliferazione cellulare incontrollata.<sup>37</sup> Tale mutazione genetica determina lo sviluppo in epoca giovanile di centinaia o addirittura migliaia di polipi adenomatosi, solitamente tubulari e sessili lungo tutto il colon, ma anche a carico del tratto gastroenterico superiore, che se non rimossi chirurgicamente portano alla trasformazione neoplastica nella totalità dei casi. La FAP si manifesta clinicamente nella seconda decade di vita per l'incremento numerico e dimensionale di adenomi che, se non adeguatamente trattati, evolvono in carcinomi nella terza e quarta decade di vita.<sup>38</sup> Pertanto, l'atto di prevenzione secondaria più efficace è l'intervento di colectomia totale con ileo-retto anastomosi, quando vi sia un modesto interessamento rettale da parte della poliposi; qualora, invece, il numero di polipi a livello del retto sia molto elevato, è preferibile eseguire una proctocolectomia totale e successiva anastomosi ileo-anale con confezionamento di reservoir.<sup>39,40</sup> Inoltre questi pazienti presentano un aumentato rischio di neoplasie rare quali epatoblastomi dell'infanzia, carcinomi papillari della tiroide e medulloblastomi; frequente è il riscontro di tumori desmoidi, macchie da iperpigmentazione retinica, osteomi di mandibola e cranio, alterazioni dentarie eterogenee. Altre anomalie variamente presenti che affiancano i polipi multipli del tratto

gastro-enterico, definiscono la Sindrome di Gardner<sup>41</sup> (osteomi multipli, tumori desmoidi e fibromi cutanei) e la Sindrome di Turcot (polipi multipli intestinali e tumori cerebrali). Da ricordare anche la forma attenuata di FAP (AFAP)<sup>43</sup> caratterizzata da specifiche mutazioni del gene APC<sup>44</sup>, dalla presenza di un numero inferiore di polipi-generalmente non superiore a 50-prevalentemente nel colon prossimale e con un esordio più tardivo della forma classica (circa a 60 anni).<sup>45</sup>

La Sindrome di Lynch<sup>46</sup> è una malattia autosomica dominante, ad alta penetranza, presente in 2 varianti; alcuni studi la ritengono responsabile del 15% dei carcinomi del colon-retto, altri dati più recenti ridimensionano la sua frequenza al 5%. La malattia è caratterizzata da una maggior frequenza di tumori colici multipli e dalla comparsa di neoplasie, prevalentemente nel colon prossimale, che insorgono ad un'età più precoce delle forme di cancro sporadico (50 anni). Nella variante 1 della malattia la patologia interessa prevalentemente il colon destro, mentre nella Lynch 2 vi è un aumentato rischio di sviluppo di neoplasie endometriali, del tratto urinario e del sistema biliare.<sup>47</sup>

Per la diagnosi di HNCCP, in base ai criteri di "Criteri di Amsterdam"<sup>48</sup>, si devono ritrovare:

- Nella stessa famiglia tre affetti da CRC;
- Un parente di primo grado rispetto agli altri due;
- Cancro diagnosticato prima dei 50 anni;
- Due o più generazioni affette;
- Esclusione di FAP;

Il difetto genico alla base della Sindrome di Lynch a è a carico di geni implicati nella riparazione del DNA, noti come geni del mismatch repair (MMR genes), i quali codificano per enzimi capaci di riparare gli errori di appaiamento di basi che possono verificarsi nel corso della replicazione del DNA.<sup>49</sup> In particolare, mutazioni dei geni *hMLH-1* (localizzato nella regione cromosomica 3p) e *hMSH-2* (localizzato nella regione cromosomica 2p) comprendono circa il 60% dei casi di HNPCC, mentre meno frequentemente sono coinvolti i geni *hPMS1* (localizzato nella regione cromosomica 2q), *hPMS2* (localizzato nella regione cromosomica 7p) ed altri geni, appartenenti alla stessa famiglia, non ancora identificati. Conseguentemente a queste alterazioni geniche, deriva una maggiore instabilità genomica che costituisce una condizione fortemente predisponente l'insorgenza di ulteriori mutazioni e la cancerogenesi. Una spia di questa particolare tendenza all'instabilità genomica ed indice della presenza di mutazione dei geni MMR è la cosiddetta "instabilità dei microsatelliti" (Micro-Satellite Instability, MSI),

ovvero la presenza di alterazioni in alcune sequenze di DNA dette “microsatelliti”, formate dalla ripetizione fino a 50.000-100.000 volte di mono-, di-, tri- o tetra-nucleotidi, uniformemente distribuite nel genoma.

Forme ereditarie meno frequenti sono la Sindrome di Peutz-Jeghers e la “poliposi giovanile”.<sup>50,51</sup> La prima, a trasmissione autosomica dominante, è caratterizzata da pochi e grandi polipi del piccolo intestino associati a melanosi peri-orbitaria, buccale, delle mani e polipi amartomatosi in vie respiratorie, urinarie e biliari che, sebbene non abbiano un potenziale maligno, possono evolvere in adenomi e quindi carcinomi. La seconda si presenta esclusivamente con amartomi a livello colico. In entrambe le due forme le alterazioni sono poligeniche e comprendenti geni come PTEN, SMAD4 e altri siti ad oggi non noti.

### *1.3 SCREENING*

Obiettivo della prevenzione secondaria è di ridurre la mortalità specifica di una determinata neoplasia, andandola a diagnosticare -e quindi curare- precocemente, condizione non sempre possibile da realizzare e spesso non correlata ad un reale beneficio per il paziente. Il cancro colon-rettale si presenta come prototipo di neoplasia in cui la prevenzione secondaria è efficace; numerosi studi infatti dimostrano come una diagnosi precoce possa diminuire la mortalità cancro-correlata del 50% ogni anno. Lo screening nel CRC risulta particolarmente vantaggioso in termini di rapporto costo/beneficio, in quanto:

- Il CRC è un tumore frequente, ad alta mortalità e con una lunga fase pre-clinica (che ci permette di identificare la neoplasia quando ancora non è avanzata)
- la diagnosi precoce è effettivamente nel CRC la miglior cura (non in tutte le neoplasie esiste questa correlazione)
- sono disponibili test sensibili, specifici (fondamentali per evitare di allarmare ingiustificatamente il paziente), economici, semplici e relativamente non invasivi

In primis è fondamentale distinguere nella popolazione 3 diversi gruppi di rischio, al fine di orientare coerentemente le metodiche di screening e applicarle con tempistiche differite. Riconosciamo nella popolazione da screenare:

- soggetti a rischio generico (70-80%): soggetti asintomatici, di età superiore a 50 anni, senza storia familiare o personale di neoplasia gastro-intestinale,

ovarica o uterina ,senza altri fattori di rischio noti per CRC; unico elemento di rischio per la malattia è quindi l'età.

- soggetti a rischio moderato(15%): asintomatici ma con un'anamnesi patologia remota positiva per adenomi e CRC, tumori ovarici o della cervice uterina oppure con un'anamnesi familiare positiva per adenomi e CRC (soprattutto se diagnosticati in un parente di primo grado ad un'età inferiore ai 60 anni)
- soggetti a rischio elevato (5-10%): pazienti aventi malattie intestinali infiammatorie croniche (soprattutto retto-colite ulcerosa) e con FAP o HNPCC.

Le attuali linee guida proposte dall'AIOM<sup>52</sup> riconoscono 2 principali gruppi di test per lo screening della popolazione:

- test che identificano polipi adenomatosi e cancro (lesioni sia sanguinanti che non): sigmoidoscopia, colonscopia, clisma doppio contrasto, TC del colon 3D (ottime immagini ma impossibilità di asportazione della formazione neoplastica e massiccia dose di radiazioni).
- test che identificano esclusivamente il cancro (lesioni sanguinanti): esame del sangue occulto tramite GUAJAC test (Hemocult), FIT (fecal immunochemical test), test di dosaggio della porfirina fecale (Hemoquant) e il più recente SDNA test<sup>53</sup>.

La ricerca del sangue occulto nelle feci (RSO) tramite GUAJAC test è una delle metodiche di screening più utilizzata per la sua facile esecuzione, alta compliance e scarso costo; tuttavia l'indagine non è scevra da falsi positivi (con notevole disagio per il paziente) e falsi negativi (mancato riconoscimento di lesioni neoplastiche o pre-neoplastiche in quanto non sanguinanti). Inoltre una positività al test deve comunque essere seguita da una conferma endoscopica, da qui il problema se sia opportuno eseguire la colonscopia come screening di primo livello, indipendentemente dal costo. Nonostante la scarsa specificità (non tutti i sanguinamenti intestinali sono riconducibili a neoplasia) e sensibilità (rileva nel 90% di pazienti sanguinamenti superiori a 20 ml/die)<sup>54</sup>, studi prospettici randomizzati hanno dimostrato la sua efficacia nel ridurre la mortalità CRC correlata.<sup>55-57</sup>

Attuale alternativa all'Hemocult è il FIT test, metodica immunologica basata sull'uso di anticorpi specifici contro il sangue umano (ma minor specificità per il sanguinamento gastro-enterico) non influenzata da farmaci e alimenti, altamente sensibile, necessita di uno, massimo 2, campioni fecali. Le attuali linee guida raccomandano l'utilizzo di una metodica in alternativa all'altra.<sup>52, 58</sup>

Tecnica più recente è l' SDNA (stool DNA test) di elevato costo ma anche notevole sensibilità, specificità e alto valore predittivo; questa metodica infatti può estrarre DNA da cellule di sfaldamento della mucosa del colon, ricercandone poi le alterazioni associate a neoplasia.<sup>59</sup>

La sigmoidoscopia con strumento flessibile (maggior capacità diagnostica e minor disagio per il paziente rispetto al medesimo esame condotto con strumento rigido) si è visto essere una metodica effettivamente correlata ad una riduzione di incidenza e mortalità del CRC, ma è gravata da un limite non irrilevante; tale procedura infatti, esplorando solo il colon sinistro, può rilevare solo un terzo delle formazioni neoplastiche intestinali. Inoltre reperire un adenoma alla sigmoidoscopia obbliga ad esaminare la rimanente parte di colon prossimale con la colonscopia; dato quindi lo scarso rapporto costo/beneficio il suo uso si è piuttosto ridotto negli ultimi 10 anni.

La colonscopia risulta indubbiamente la migliore tecnica diagnostica e terapeutica, con una buona sensibilità nell'identificazione di polipi di dimensioni inferiori a 0,5 cm, prossima al 100% per l'individuazione di carcinomi ed alta specificità.<sup>60</sup> Tuttavia tale metodica è di difficile applicazione nella popolazione generale, sia per la scarsa compliance dei pazienti ad un esame di fatto invasivo, sia per l'alto costo derivante dalla diffusione su larga scala. Negli States la recente sensibilizzazione sull'utilità di questa indagine ha condotto ad una maggior adesione, diventando il test di screening più utilizzato, mentre in Europa, ad oggi, la colonscopia è utilizzata come metodica di secondo livello dopo positività alla RSO, necessario compromesso tra attuabilità ed efficacia dei programmi di screening.<sup>60</sup>

Nella popolazione a rischio generico e moderato le indicazioni sulle modalità di screening non sono univoche; la colonscopia ogni 10 anni a partire da 50 anni rappresenta il "golden standard", a danno però di una scarsa accettazione del test. Alternative plausibili possono essere la sigmoidoscopia ogni 5 anni (con i limiti sopra elencati), il clisma doppio contrasto o la TC del colon sempre ogni 5anni; la ricerca del sangue occulto delle feci, avendo bassa sensibilità, deve essere ripetuto almeno ogni 2 anni affinché lo screening risulti efficace.

Nei soggetti ad alto rischio è inevitabilmente necessario agire con maggiore aggressività; nei pazienti con familiarità semplice (un solo familiare affetto, con tumore diagnosticato dopo i 60 anni) è opportuno iniziare una RSO 10-15 anni prima dell'età di comparsa della neoplasia nel familiare e poi procedere con lo schema di screening della popolazione

generale. Nei casi di familiarità complessa (più di un familiare affetto e con neoplasia diagnosticata ad un'età inferiore a 50 anni) è necessario non solo essere precoci nello screening –generalmente iniziato a 40 anni- ma anche aggressivi, partendo subito con la colonscopia, la quale verrà ripetuta ogni 5 anni. Soggetti con un solo parente di secondo o terzo grado affetto da CRC hanno un rischio equivalente a quello della popolazione generale.

Nelle malattie infiammatorie croniche intestinale la sorveglianza parte dopo circa 10 anni di colite e viene ripetuta ogni 2-3 anni.

Infine, in pazienti con familiarità per HNPCC la sorveglianza deve essere effettuata con colonscopia, deve iniziare all'età di 25 anni e deve essere ripetuta ogni 5 anni fino all'età di 75 anni. In soggetti con FAP la sigmoidoscopia (ancor meglio la colonscopia) dovrebbe essere offerta ai soggetti che non hanno la mutazione a partire da 13 anni fino all'età di 30 e poi ogni 5 anni.

#### *1.4 CENNI DI ANATOMIA PATOLOGICA*

L'importanza nel carcinoma coloretale di screening e diagnosi precoce, trovano giustificazione proprio nell'iter anatomico-patologico di questa neoplasia, che parte come lesione in situ, quindi limitata a mucosa e non infiltrante, accrescendosi poi con diverse modalità a seconda della sede<sup>61</sup> e diventando infine invasiva. La maggior parte di CRC si sviluppa infatti da lesioni benigne, quindi immediato è il collegamento con la possibilità di interrompere la successione di eventi carcinogenici, sottoponendo a screening periodico pazienti a rischio. Esiste infatti un rapporto sequenziale tra adenoma e carcinoma colon rettale<sup>25</sup> e tale correlazione è accertata da una serie di osservazioni tra cui:

- nelle popolazioni ad alto numero di adenomi c'è una maggior frequenza di carcinomi
- la localizzazione di adenomi è sovrapponibile a quella dei carcinomi
- il picco di frequenza di adenomi è leggermente anticipato (5-8 anni) rispetto al picco di frequenza dei carcinomi
- un carcinoma diagnosticato precocemente è solitamente circoscritto da un adenoma
- il rischio di sviluppare un carcinoma è statisticamente correlato al numero di adenomi che il paziente ha (rapporto di diretta proporzionalità tra numero di adenomi e rischio di carcinoma)

- i programmi di identificazione precoce degli adenomi riducono significativamente l'incidenza di carcinomi.

Sebbene sia ormai dimostrato il ruolo di precursore degli adenomi nei confronti dei carcinomi coloretali invasivi, solo il 10% degli adenomi ha evoluzione carcinomatosa, con un rischio aumentato per le lesioni multiple, di dimensioni maggiori, con istologia villosa e contenenti foci displastici.

Esistono 4 principali quadri di aspetto macroscopico in cui si può presentare la lesione tumorale:

- carcinoma polipoide ben circoscritto – forma vegetante;
- carcinoma ulcerato a margini rilevati – forma ulcerata;
- carcinoma ulcerato a margini rilevati ed estesi – forma ulcero-infiltrante;
- carcinoma diffuso, infiltrante e stenosante – forma anulare-stenosante.

Macroscopicamente, i tumori del colon prossimale tendono ad accrescersi lungo la parete colica in senso longitudinale, realizzando delle masse vegetanti (esofitiche), che, dato l'ampio lume intestinale, solo tardivamente danno sintomi occlusivi; neoplasie situate in sede prossimale sono generalmente più insidiose e subdole delle distali in quanto hanno un lasso esteso di tempo in cui rimangono silenti, ma capaci di infiltrare la parete intestinale, diffondendosi progressivamente. Diversamente, le neoplasie del colon distale tendono a nascere nel contesto di un polipo, raggiungono la parete intestinale, la infiltrano e si accrescono circolarmente, formando inizialmente una “mezzaluna” che successivamente assumerà una forma ad anello. La diffusione circonferenziale e l'intensa reazione desmoplastica tumorale (proliferazione di fibroblasti e produzione di collagene) portano ad una retrazione cicatriziale del lume intestinale e sono tipicamente responsabili della stenosi di esso e delle conseguenti alterazioni dell'alvo; inoltre le lesioni tumorali del colon distale vanno precocemente incontro ad erosione superficiale e quindi ulcerazione.

In entrambi i tipi di lesione sono quindi presenti margini rilevati, segno della tendenza del tumore a vegetare, infiltrazione della parete intestinale e possibile interessamento della superficie della sierosa sotto forma di placche biancastre.

Malgrado queste differenze macroscopiche, le caratteristiche microscopiche dei tumori del colon prossimale e distale sono pressoché sovrapponibili.

Secondo la classificazione istologica elaborata dalla World Health Organization<sup>62</sup> si riconoscono:

- adenocarcinoma, costituito dalla proliferazione di cellule neoplastiche cilindriche che compongono lumi ghiandolari (85% dei casi);
- adenocarcinoma mucinoso (10%) caratterizzato dalla presenza di abbondante muco extracellulare, che costituisce oltre il 50% del volume tumorale;
- carcinoma a cellule ad anello con castone, costituito per più del 50% da cellule con un vacuolo intracitoplasmatico contenente mucina, che disloca il nucleo in periferia;
- carcinoma midollare, prevalentemente costituito da lamine e trabecole solide di cellule, in genere regolari e con modeste atipie nucleari, e caratterizzato dalla presenza di numerosi linfociti intraepiteliali;
- carcinoma indifferenziato, privo di aspetti morfologici di differenziazione epiteliale;
- carcinoma a piccole cellule, con caratteristiche morfologiche e biologiche simili a quelle del carcinoma a piccole cellule polmonare;
- carcinoma adenosquamoso, con aree di tipo ghiandolare miste ad aspetti squamosi;
- carcinoma squamoso, con aspetti morfologici di tipo squamoso.

Escludendo gli adenocarcinomi, gli altri istotipi nel complesso coprono meno del 5% dei CRC, mentre i carcinomi squamosi ed adenosquamosi sono molto rari.

La differenziazione cellulare può essere definita in base alla presenza o assenza di determinati parametri, quali la conservazione della polarità del nucleo, la presenza e configurazione delle strutture ghiandolari, il pattern di crescita, l'infiltrazione infiammatoria e la reazione desmoplastica. Si identificano 4 gradi di differenziazione cellulare (grading):

- grado 1 (G1): neoplasie ben differenziate, caratterizzate da cellule cilindriche simili alla loro controparte adenomatosa, che invadono la sottomucosa e la tonaca muscolare propria;
- grado 2 (G2): neoplasie moderatamente differenziate;
- grado 3 (G3): neoplasie scarsamente differenziate;
- grado 4 (G4): neoplasie anaplastiche del tutto prive di strutture ghiandolari<sup>61</sup>

Altri parametri istologici che sono presi in considerazione nella caratterizzazione dei CRC, soprattutto in funzione di una correlazione con le scelte terapeutiche, sono l'invasione linfovaskolare e perineurale, il tipo di crescita (espansiva o infiltrativa), il



grado di infiltrazione linfocitaria al margine di invasione, la presenza di aggregati nodulari linfocitari peritumorali (reazione linfocitaria “tipo Crohn”), il numero di linfociti compenetranti le cellule neoplastiche (tumor infiltrating lymphocytes, TIL).<sup>63</sup>

Lo studio della biologia molecolare del processo di cancerogenesi tumorale è diventato parte integrante della valutazione istopatologica dei pazienti affetti da CRC. Da molti anni è nota la successione di alterazioni genetiche cumulative che portano ad una progressiva disregolazione dei processi di proliferazione cellulare e si presentano parallelamente a modificazioni morfologiche della cellula epiteliale che sono, in ultima analisi, responsabili del processo di cancerogenesi.<sup>64</sup> Generalmente il primo evento, che apre la “cancerogenesi multi-step” del CRC è la mutazione sul gene APC –alterato nell’80% di adenomi e carcinomi- generalmente espresso nella sintesi della proteina APC in forma tronca. La proteina APC, in condizioni fisiologiche, lega fasci di microtubuli, favorisce la migrazione e l’adesione cellulare e regola i livelli di  $\beta$ -catenina. Quest’ultima svolge un ruolo importante nell’adesione cellula-cellula, legando i recettori della caderina ai filamenti di actina del citoscheletro ed è coinvolta nella via di segnalazione Wnt<sup>65</sup>, responsabile del destino cellulare, soprattutto durante le fasi dello sviluppo. La diretta conseguenza di tale alterazione è un accumulo di beta catenina –i cui livelli sono regolati proprio dal gene APC- migrazione nel nucleo di essa, dove lega una serie di fattori di trascrizione, che inducono poi eventi a cascata stimolanti la proliferazione cellulare e inibenti la morte cellulare programmata.<sup>66</sup> La mutazione di un unico allele del gene APC rende la cellula maggiormente incline a sviluppare successive alterazioni, mentre l’interessamento di entrambi le varianti alleliche conduce alla proliferazione cellulare incontrollata e quindi alla formazione di un polipo adenomatoso. Altre mutazioni implicate nel processo di cancerogenesi interessano il gene p53 (mutato o perso nell’80% dei CRC), portando ad una attivazione delle telomerasi, implicate nel mantenimento della stabilità del telomero e capaci di rendere la cellula immortale<sup>67</sup> e la perdita delle SMAD. Quest’ ultime sono coinvolte nella via di segnalazione del TGF- $\beta$ , e se alterate appaiono correlate nel promuovere la progressione verso forme invasive di CRC.

Mutazioni del gene *KRAS*, proto-oncogene che codifica per una proteina di legame posta a valle dell’ Epidermal growth factor receptor (EGFR), determinano una attivazione costitutiva di questa cascata del segnale; tale condizione rende quindi inefficace l’inibizione dell’ EGFR perseguita dalla terapia biologica. Ulteriori dettagli saranno più specificatamente trattati nel paragrafo dedicato.

## 1.5 QUADRO CLINICO MODALITA' DI DIFFUSIONE ED ESAMI DIAGNOSTICI

La maggior parte dei carcinomi colo-rettali iniziali è asintomatico o i sintomi –se presenti- sono aspecifici; tuttavia i diversi quadri clinici possono spesso essere giustificati dalla sede, dall'estensione locale e a distanza della malattia e da eventuali complicanze.<sup>68</sup>

I sintomi principali variano a seconda che il tumore interessi il colon prossimale o distale; se la neoplasia riguarda il colon destro prevale un quadro clinico più vago e aspecifico, con dolore addominale tendenzialmente gravativo e subcontinuo nei quadranti addominali destri, astenia, anoressia, dispepsia e con il protarsi nel tempo della malattia, può comparire melena e massa palpabile in fossa iliaca destra; non infrequente è una anemizzazione da sanguinamento occulto, diretta conseguenza di lesioni ulcerate di lunga durata.

Se ad essere interessato è invece il colon sinistro, dominano sintomi legati all' alvo ovvero stipsi, stipsi alternata a diarrea, tenesmo, dolore crampiforme, sangue nelle feci (talora anche molto abbondante) e melena. Questi due diversi quadri trovano giustificazione nella struttura anatomica del colon ( lume ampio nel colon ascendente, in cui raramente una lesione può accrescersi fino ad ostruire il transito intestinale, calibro ristretto nel colon discendente) e nella diversa morfologia della lesione neoplastica; infatti mentre nel segmento colico destro si sviluppano prevalentemente masse polipoidi esofitiche, nel colon sinistro più frequenti sono lesioni ad accrescimento infiltrante e stenotante.

Tenesmo, rettorragia, mucorrea, feci nastriformi, dolore gravativo, perianale e perineale sono generalmente suggestivi di neoplasie del retto.

Importante precisare come i sintomi tipici del CRC compaiano solo nel 40% dei casi e come spesso i pazienti tendano a sottovalutare il sintomo, arrivando così ad una diagnosi spesso tardiva, dove le opzioni terapeutiche-anche se presenti- non possono ambire ad un intento radicale. Nel 25% dei casi la diagnosi avviene in fase metastatica di malattia, in cui la sintomatologia si riduce ad una sensazione gravativa in ipocondrio destro, generalmente indice di una epatomegalia; ulteriori aspetti sulla malattia metastatica saranno trattati nel capitolo dedicato.

I carcinomi intestinali possono diffondere per continuità (infiltrazione neoplastica nella parete intestinale con estensione lungo la parete dell' organo), per contiguità (infiltrazione di organi circostanti, con possibili fistole in stomaco, vagina e vescica), per via endocavitaria (con possibile carcinosi peritoneale), linfatica ed ematica.<sup>69</sup>

La diffusione ematica avviene soprattutto tramite il sangue portale poiché colon e retto sono in massima parte tributari delle vene mesenteriche; l'organo maggiormente interessato è pertanto il fegato. Il retto inferiore è tributario della circolazione sistemica attraverso le vene emorroidarie inferiori e medie; possibili possono essere anche metastasi vertebrali per anastomosi con il plesso venoso vertebrale.

La diffusione linfatica varia a seconda della sede di insorgenza del tumore ed interessa i linfonodi epicolici addossati alla parete intestinale, paracolici situati sul margine mesenterico, intermedi lungo il decorso delle arterie coliche e principali siti all'origine dell'arteria colica di riferimento e delle arterie mesenteriche. Nel retto superiore ed in una parte del retto inferiore sono coinvolti i linfonodi emorroidari superiori che afferiscono al meso-sigma. La via media drena parte del retto inferiore e del canale anale e raggiunge i linfonodi ipogastrici. La via inferiore giunge ai linfonodi inguino-crurali. La principale via di diffusione è la superiore; la media e la inferiore divengono importanti in caso di inversione del flusso per blocco linfatico.

L'exitus nei pazienti con CRC avviene spesso in conseguenza della compromissione massiva di fegato, polmone o encefalo, o per complicanze ostruttive intestinali, ureterali, perforazioni, emorragie.

Le sedi di diffusione sono i linfonodi soprattutto come diffusione loco-regionale, mentre il fegato è la sede a distanza più frequentemente interessata; un'eccezione è costituita dai tumori del retto basso che diffondono nei polmoni. 1/5 dei pazienti metastatici muore con sole metastasi epatiche, quindi bisogna trattare anche questa sede di diffusione. Poi prestare attenzione al polmone, all'addome con il carcinoma peritoneale, e raramente lo scheletro e l'encefalo che non costituiscono le sedi iniziali di diffusione bensì sono importanti sedi nella fase avanzata.

In caso di sospetto diagnostico di CRC primo imprescindibile step è l'anamnesi, la quale sarà volta a valutare l'esordio della sintomatologia e la sua durata, l'eventuale fascia di età di rischio (dai 35-40 anni in poi), la familiarità. Immediatamente successivo all'anamnesi è l'esame obiettivo con esplorazione rettale, manovra che, con una accuratezza operatore-dipendente, variabile dal 44 all'83%, può consentire la palpazione della lesione (non differenziando tra patologia infiammatoria e neoplastica) e la diagnosi nel 10% dei casi dei tumori rettali.<sup>69</sup>

L'esame cardine per la conferma diagnostica è la colonscopia, che con sensibilità e specificità che sfiorano il 100%, ci permette di esplorare l'intero colon, sino alla valvola ileo-cecale. Questo esame endoscopico ha una duplice valenza:

- diagnostica, per la possibilità di visualizzare direttamente la lesione ed effettuare su di essa prelievi biotici, dirimenti per la conferma istologica
- terapeutica, per la capacità di asportare neoformazioni polipoidi di accertata benignità

La tecnica comunque non è scevra da rischi, seppur minimi, quali perforazioni nello 0,1% dei casi, emorragia maggiore nello 0,3%, mortalità dello 0,01-0,03%.<sup>69</sup>

Esami alternativi, effettuabili laddove la colonscopia non sia dirimente o praticabile, sono l’RX con clisma opaco, utile in presenza di lesioni stenosanti che impediscano il transito dell’endoscopio o nelle sindromi aderenziali e la colonscopia virtuale. Quest’ultimo recente esame, non ancora routinario per i costi ed i limiti operativi, abbina la tecnica del clisma con doppio contrasto alla TC tridimensionale in modo da creare una ricostruzione del colon, con una sensibilità vicina a quella della colonscopia. Tuttavia tale metodica è gravata dall’impossibilità di effettuare prelievi biotici o asportazione di lesioni benigne, dal “disconfort” della preparazione pre-indagine, dalla necessità di un personale altamente addestrato e non ultimo, dalla nocività delle radiazioni. Attualmente quindi, la colonscopia virtuale è utilizzata come alternativa al clisma opaco in centri altamente preparati o come metodica di studio del colon in pazienti per cui gli studi endoscopici non siano stati conclusivi, data la presenza di lesioni ostruttive. Infine la TC-colonscopia consente di identificare polipi non rilevati alla colonscopia.<sup>70,71</sup>

Per la diagnosi di neoplasia del retto, metodica altamente sensibile, specifica e pressoché priva di complicanze è la rettosigmoidoscopia, indagine in grado di studiare circa 60 cm di colon a partire dall’ano; la conoscenza dell’ esatta distanza della lesione dalla rima anale, è infatti parte integrante e necessaria dello studio del carcinoma rettale. Informazioni sul grado di infiltrazione della parete e sull’interessamento linfonodale possono essere fornite dall’impiego di sonde ecografiche o eco endoscopi.

## *1.6 STADIAZIONE*

La diagnosi di CRC precede un secondo momento cruciale per la scelta dell’iter terapeutico: la stadiazione. Per essa si parte da un accurato esame obiettivo, che può evidenziare una epatomegalia sospetta di localizzazione secondaria di malattia e da una pancolonscopia se non già effettuata in precedenza. Utili –anche se aspecifici- possono risultare emocromo, esami di funzionalità epatica e bilancio idro-elettrolitico; il CEA (antigene carcino-embriionario) viene comunemente valutato nella stadiazione pre-operatoria- alti livelli di questo marker alla diagnosi rivestono un ruolo prognosticamente

negativo- ma risulta di ben superiore importanza nel follow up post-resezione e nel monitoraggio della risposta terapeutica, insieme a CA 19.9.

Realmente illustrativa della malattia è la TC dell'addome, che trova viva indicazione per la ricerca di metastasi epatiche e linfonodali nel CRC; la valutazione polmonare essere eseguita con RX o TC del torace. Una TC pelvica nel carcinoma del retto è di fondamentale importanza per valutare l'estensione locale di malattia, con una massima accuratezza negli stadi più avanzati di malattia (81% in stadi C e D versus un 17% degli stadi B).

L'ecografia addomino-pelvica può consentire la visualizzazione della lesione primitiva, ma non ha un ruolo nella valutazione di T ed N, dal momento che non modifica l'approccio terapeutico; è indicata prevalentemente nella ricerca di metastasi epatiche, dove in mano ad operatori esperti ha una sensibilità prossima alla TC.

Nel tumore del retto, per valutare l'estensione locale (T), fondamentale risulta essere l'ecografia trans-rettale e la RMN della pelvi che consentono così di valutare il grado di infiltrazione della neoplasia nella parete intestinale, nel mesoretto, nel plesso venoso, nel grasso peri-rettale.<sup>72</sup>

Ulteriori metodiche in grado di caratterizzare le lesioni secondarie a livello del fegato sono l'ecografia e la RM potenziata.<sup>73,74</sup> Questi esami infatti ci forniscono dati indispensabili nel pianificare correttamente il trattamento in quanto, se è presente un'infiltrazione del mesoretto è necessario programmare una chemioterapia neo-adiuvante. Purtroppo tutt'oggi molti pazienti con tumore del retto extra-peritoneale non ricevono una stadiazione corretta; la TC della pelvi non consente di valutare al meglio l'estensione loco-regionale e quindi pazienti con tumore localmente avanzato vengono portati a chirurgia, senza che questo sia l'approccio terapeutico ottimale in questi casi. Inoltre rimane ancora una sfida valutare attraverso l'imaging la carcinomatosi peritoneale, in quanto le metodiche attualmente disponibili risultano inadeguate.<sup>75</sup>

Infine la PET (Positron Emission Tomography) con 18fluoro-2-desossi-D-glucosio può essere utile per identificare eventuali sedi extraepatiche secondarie di malattia.

La stadiazione attualmente presente negli Stati Uniti ed in Europa corrisponde a quella di Dukes modificata da Astler-Coller nel 1954 e, successivamente, da Turnball nel 1967. La revisione di Astler-Coller ha suddiviso la categoria C (linfonodi positivi) in C1 (coinvolgimento dei linfonodi regionali) e C2 (coinvolgimento dei linfonodi apicali, cioè posti sul punto di legatura dei vasi sanguigni), mentre quella di Turnball ha inserito la categoria D, per indicare la presenza o assenza di metastasi.

### *Stadiazione di Dukes modificata*

---

<b>Stadio A</b>	Tumore limitato alla mucosa
<b>Stadio B1</b>	Tumore non esteso oltre la muscolare propria
<b>Stadio B2</b>	Tumore esteso oltre la muscolare propria, senza coinvolgimento linfonodale
<b>Stadio C1</b>	Presenza di metastasi ai linfonodi apicali
<b>Stadio D</b>	Presenza di metastasi a distanza

---

Il sistema TNM,<sup>76</sup> raccomandato dall'AJCC (American Joint Committee on Cancer) a partire dal 1950, pone maggiore chiarezza rispetto alla stadiazione di Dukes. Questo sistema stadiativo include una classificazione clinica (indicata con il prefisso "c"), per la scelta terapeutica ed una patologica post-chirurgica (indicata con il prefisso "p"); la quale ha valore prognostico; inoltre in seguito alla diffusione delle terapie neoadiuvanti, è stato introdotto il prefisso "y" che indica la stadiazione patologica dopo terapia neo-adiuvante.

La classificazione TNM valuta la malattia neoplastica attraverso lo studio di tre parametri: T (Tumor) indica l'estensione locale della malattia; N (Nodes) il numero dei linfonodi coinvolti e M (Metastasis) la presenza di localizzazioni a distanza. I tumori resecati in modo radicale sono classificati R0, resezioni tumorali con margini positivi sono definite R1, mentre la persistenza di tumore macroscopico per incompleta resezione è indicata come R2.

**Stadiazione TNM.**

<b>T</b>	<b>Tumore primitivo</b>
<b>Tx</b>	Tumore primitivo non definibile
<b>T0</b>	Nessuna evidenza di tumore primitivo
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ: intraepiteliale o invasione della tonaca propria della mucosa
<b>T1</b>	Tumore che infiltra la sottomucosa
<b>T2</b>	Tumore che infiltra la tonaca muscolare
<b>T3</b>	Tumore che infiltra a tutto spessore la tonaca muscolare con invasione della sottosierosa o dei tessuti pericolici o perirettali non rivestiti da sierosa
<b>pT3a</b>	minima invasione (<1mm oltre la muscolare propria)
<b>pT3b</b>	invasione >5mm oltre la muscolare propria
<b>pT3c</b>	invasione moderata (da 5 a 15mm oltre la muscolare propria)
<b>pT3d</b>	invasione estesa (>15mm oltre la muscolare propria)
<b>T4</b>	Tumore che infiltra direttamente altri organi o strutture e/o il peritoneo viscerale
<b>N</b>	<b>Linfonodi regionali</b>
<b>Nx</b>	Linfonodi regionali non possono essere accertati
<b>N0</b>	Linfonodi regionali liberi da metastasi
<b>N1</b>	Metastasi in 1-3 linfonodi regionali
<b>N1a</b>	metastasi in un linfonodo regionale
<b>N1b</b>	metastasi in 2-3 linfonodi regionali
<b>N1c</b>	depositi tumorali nella sottosierosa, nel mesentere o nei tessuti pericolici o perirettali non ricoperti da peritoneo, in assenza di metastasi nei linfonodi regionali.
<b>N2</b>	Metastasi in 4 o più linfonodi regionali
<b>N2a</b>	metastasi in 4-6 linfonodi regionali
<b>N2b</b>	metastasi in >7 linfonodi regionali
<b>M</b>	<b>Metastasi a distanza</b>
<b>Mx</b>	Presenza di metastasi non accertabile
<b>M0</b>	Assenza di metastasi a distanza
<b>M1</b>	Presenza di metastasi a distanza
<b>M1a</b>	metastasi confinate a un solo organo o sito (ad esempio, fegato, polmone, ovaio, linfonodi non regionali)
<b>M1b</b>	metastasi in più di un organo o sito o a livello del peritoneo.

Esiste poi una distinzione della malattia in base allo stadio, nella quale possono essere unificate le altre due classificazioni, che tiene conto della prognosi.

Confronto tra classificazione di Dukes modificata Astler-Coller, TNM, stadiazione chirurgica e tassi di sopravvivenza:

<b>Dukes</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>Stadio</b>	<b>OS a 5 anni</b>
A	Tis	N0	M0	0	100%
	T1	N0	M0	I	90-100%
B1	T2	N0	M0		
B2	T3	N0	M0	IIA	84,7%
B2	T4	N0	M0	IIB	72,2%
C1	T1-T2	N1	M0	IIIA	83,4%
	T3-T4	N1	M0	IIIB	64,1%
C2	Ogni T	N2-N3	M0	IIIC	44,3%
D	Ogni T	Ogni N	M1	IV	8,1%



## *1.7 IL TRATTAMENTO DELLA MALATTIA LOCALIZZATA*

### *1.7a Cenni di terapia chirurgica*

Esiste pieno accordo nel riconoscere il ruolo essenziale della chirurgia nell'ottenimento della guarigione; tuttavia è sempre più viva la consapevolezza che i migliori risultati si ottengono attraverso la programmazione di una strategia multi-disciplinare impostata prima di ogni atto terapeutico e considerando tutto lo spettro di opzioni curative disponibili.

Gli elementi essenziali di una chirurgia curativa per il CRC includono la rimozione del tumore primario con adeguati margini di resezione, la linfadenectomia regionale e il ripristino della continuità del tratto gastrointestinale.<sup>77</sup>

L'estensione della resezione è strettamente dipendente da sede, vascolarizzazione e drenaggio linfatico della neoplasia, oltre che della presenza o meno di una diretta invasione della neoplasia negli organi adiacenti. È fondamentale, inoltre, che le estremità dell'intestino si raggiungano senza tensione ed abbiano un'adeguata vascolarizzazione.

Per le lesioni localizzate nel cieco, colon ascendente e flessura epatica, l'emicolectomia destra rappresenta la procedura chirurgica di scelta; questa prevede la rimozione dell'intestino a partire da 4-6 centimetri prossimalmente alla valvola ileo-ciecale, sino alla porzione di colon trasverso vascolarizzata

dalla branca destra dell'arteria medio-colica ed una anastomosi tra ileo terminale ed il colon trasverso.

Per i CRC del colon trasverso il golden standard chirurgico è l'emicolectomia destra estesa, con rimozione di tutto il colon trasverso ed anastomosi confezionata fra ileo terminale e colon sinistro prossimale.

Un'emicolectomia sinistra (resezione del colon e della flessura splenica fino alla giunzione retto-sigma) rappresenta l'intervento chirurgico di scelta per i tumori localizzati a livello del colon discendente, mentre una resezione del sigma è oncologicamente adeguata per i tumori localizzati a livello del colon sigmoideo.<sup>78</sup>

La colectomia subtotala è indicata in caso di presenza di multipli tumori primari e negli individui affetti da cancro colo-rettale ereditario non polipoide<sup>79</sup>, implica la rimozione del colon, dal cieco sino alla riflessione peritoneale con il confezionamento di un'anastomosi ileo-rettale.

Sotto il profilo tecnico il trattamento chirurgico deve comprendere il segmento intestinale sede della neoplasia con margini di sicurezza ampi a monte e a valle (almeno 10 cm) ed il relativo mesentere con le stazioni di drenaggio linfatico distrettuale (12 è il numero ottimale di linfonodi da reperire nel pezzo operatorio).

Negli anni '60 fu messa a punto da R.B. Turnbull, la cosiddetta "no-touch isolation technique" che consiste nella legatura precoce dei peduncoli vascolari principali prima di qualsiasi manovra sul colon; tale tecnica nacque a causa della preoccupazione che durante la mobilizzazione del tratto colico sede del tumore, potessero staccarsi microemboli neoplastici, origine di future metastasi. Tuttavia l'unico studio randomizzato su 236 pazienti non ha dimostrato alcuna significativa differenza nella sopravvivenza a 5 anni tra braccio trattato con "no-touch isolation technique" e braccio trattato con chirurgia convenzionale.

Di maggior complessità è il trattamento del carcinoma rettale per il quale si deve tener conto, non solo del risultato oncologico ma anche della qualità della vita strettamente associata alla conservazione sfinteriale. Questa problematica si pone prevalentemente per i tumori del III distale del retto e che si trovano subito al di sopra della giunzione anorettale. La resezione anteriore del retto viene effettuata per cancri localizzati nel III medio e prossimale del retto (lesioni localizzate 5-6 centimetri sopra la linea dentata) e consiste nella rimozione del colon sigmoideo e del retto prossimale con un'anastomosi nella pelvi al di sotto della riflessione peritoneale. Il margine di resezione prossimale deve essere di almeno 5 cm, mentre 1-2 cm sono sufficienti a livello distale.

Fondamentale per la radicalità chirurgica è l'asportazione del mesoretto (total mesorectal excision TME), tessuto cellulo-adiposo a contenuto linfovaskolare, grasso e nervoso che circonda il retto; infatti la diffusione neoplastica nel mesoretto (pT3) rappresenta un importante indicatore di gravità della malattia. L'infiltrazione radiale marginale costituisce un fattore prognostico negativo indipendente di sopravvivenza (più che di recidiva) e un interessamento del margine circonferenziale dopo TME è indicativo di malattia avanzata.

La resezione addomino-perineale (procedura di Miles) consiste nella completa escissione del retto e dell'ano con una concomitante dissezione addominale e perineale, chiusura permanente del rafe perineale e creazione di una colostomia terminale. La parte addominale di questo intervento raggiunge il livello dei muscoli elevatori dell'ano con la rimozione dell'intero mesoretto e la dissezione condotta lungo la fascia parietale endopelvica,<sup>80</sup> mentre la parte perineale della procedura prevede la rimozione della giunzione ano-rettale e del retto distale unitamente al meccanismo sfinteriale dell'ano.

Questa tecnica è indicata qualora il tumore coinvolga gli sfinteri anali e penetri all'interno del setto retto vaginale o nei pazienti in cui una chirurgia con preservazione degli sfinteri anali non sia possibile a causa di una corporatura sfavorevole o in presenza di un cattivo stato del meccanismo sfinteriale.

L'asportazione locale di cancro rettale comprende la rimozione del tumore primario con una escissione a tutto spessore, seguita da un riavvicinamento della parete rettale; tale procedura però non permette la completa rimozione dei linfonodi del mesoretto e quindi limita la stadiazione operatoria. Affinché sia basso il rischio di recidive locali, comunemente non curabili, i pazienti che decidono di sottoporre a tale intervento devono essere attentamente selezionati. L'escissione locale con intento curativo è quindi indicata in caso di tumori mobili con dimensioni inferiori ai 3 centimetri<sup>81</sup>; alla biopsia, questi tumori dovrebbero essere compresi in uno stadio T1 (limitati alla sottomucosa) o T2 (limitati alla muscolare propria), bene o moderatamente differenziati, senza invasione vascolare o linfatica<sup>82</sup>. Inoltre non dovrebbe esserci alcuna evidenza di malattia linfonodale all'ecografia o alla risonanza magnetica nucleare preoperatoria. Le escissioni locali vengono inoltre utilizzate in caso di palliazione per cancro avanzato in pazienti con severe patologie concomitanti in cui una chirurgia estesa comporta rischi di elevata morbilità e mortalità.

### ***1.7 b Cenni di chemioterapia adiuvante***

La terapia adiuvante del carcinoma del colon-retto è impostata come segue:

- Nel primo stadio: T1/T2-N0 sono inclusi pazienti ad ottima prognosi, per cui non vi è indicazione a trattamenti aggiuntivi a quello chirurgico.
- Nel secondo stadio: il rischio di ripresa di malattia tende ad aumentare intorno al 15-30% quindi, nei pazienti T3-N0 dopo una attenta considerazione dei fattori di rischio (tra cui l'estensione del tumore, il numero di linfonodi asportati, il grading, eventuali quadri di ostruzione/perforazione, instabilità dei microsatelliti) è possibile optare o meno per un trattamento adiuvante, che è invece sempre indicato nei pazienti T4-N0. Nel tumore del retto T3 vi è, in linea di massima, sempre indicazione ad un trattamento adiuvante o meglio di chemioradioterapia pre-operatoria seguita eventualmente da un trattamento chemioterapico post-operatorio.

- Nel terzo stadio in cui c'è una positività dei linfonodi (N+), data la dimostrata efficacia, vi è un'indicazione di massima nell'attuare un trattamento adiuvante; tuttavia è sempre necessario valutare il singolo paziente con le proprie comorbidità e fattori di rischio e quindi orientarsi o meno verso una terapia medica. Nel tumore del retto si associa sempre un trattamento radioterapico

### *Le fluoro pirimidine*

La storia della chemioterapia del carcinoma del colon-retto è sicuramente legata al fluorouracile, che per oltre 40 anni ha rappresentato l'unica arma disponibile e che tutt'oggi, in combinazione con nuovi farmaci resi disponibili negli ultimi decenni, rimane il fulcro del trattamento per CRC.

I primi dati che hanno dimostrato l'efficacia della chemioterapia adiuvante arrivano da 2 studi effettuati dal National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP)<sup>83</sup> e dal North Central Cancer Treatment Group (NCCTG)<sup>84</sup>.

Il trial del National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) protocollo C-01 ha randomizzato 401 pazienti a ricevere: nessun trattamento dopo la chirurgia; chemioterapia con semustina, vincristina 5FU; BCG. Questo studio ha mostrato un vantaggio in disease-free survival (DFS) ( $p=0.2$ ) e in overall survivor (OS) a 5 anni ( $p=0.05$ ) nei pazienti trattati con chemioterapia rispetto a quelli trattati con sola chirurgia in stadio B o C secondo Dukes.

Il trial del NCCTG ha randomizzato 1296 pazienti con CRC in stadio II e III a ricevere trattamento con la sola chirurgia, chirurgia seguita da un anno di terapia adiuvante a base di solo Levamisolo (LEV, farmaco antelmintico) oppure chirurgia seguita da LEV e 5FU per un anno. Nei pazienti con carcinoma in stadio III, trattati con la combinazione dei due farmaci e seguiti per un follow up mediano di 6,5 anni, è emerso che un trattamento con il fluorouracile nei CRC in stadio 3 riduce il rischio di recidiva del 41% ( $p<0.0001$ ) ed il rischio di morte del 33% ( $p=0.0007$ ) rispetto ai pazienti non trattati con tale farmaco. Lo stesso studio ha inoltre messo in evidenza come la riduzione del rischio di recidiva e di morte sia significativo solo nei pazienti al III stadio, ma non dia alcun vantaggio nel II stadio.<sup>85</sup> Grazie ai risultati di questi trial nel 1990 la National Cancer Institute consensus conference ha raccomandato regimi di chemioterapia contenenti 5FU nel trattamento standard dei pazienti con CRC in stadio III. Varie strategie farmacologiche sono state impiegate al fine di potenziare l'attività di FU, come la modulazione biochimica e l'infusione continua, ma l'uso dell'acido folinico (AF), quale agente biomodulatore, ha ottenuto i miglior risultati.

Lo studio IMPACT<sup>86</sup> ha indagato l'utilità dell'associazione terapeutica 5FU/AF, somministrati secondo lo schema Mayo Clinic (5FU 425 mg/m<sup>2</sup> + AF 20 mg/m<sup>2</sup> × 5 giorni consecutivi, ripetuto ogni 28 giorni per 6 cicli), concludendo che tale trattamento adiuvante determina una riduzione delle recidive del 35% (p=0.0001) e della mortalità del 22% (p=0.0029); anche in questo studio non è stato dimostrato un chiaro beneficio derivante dal trattamento per i pazienti in stadio II, sia in termini di OS che di DFS<sup>87</sup>.

Inoltre una metanalisi di 3300 pazienti ottenuta dal confronto di 19 trials randomizzati ha mostrato che l'aggiunta di AF al 5FU raddoppia il tasso di risposte nei pazienti con mCRC e aumenta lievemente l'OS rispetto al trattamento con solo 5FU.<sup>88</sup> Questi dati sono stati confermati anche per la terapia adiuvante: un'analisi combinata di 7 studi randomizzati ha dimostrato un aumento della DFS a 5 anni dal 42% al 58% e dell'OS dal 51% al 61% in pazienti con CRC stadio III.<sup>89</sup>

Il confronto fra diversi schemi di somministrazione, in particolare il Mayo Clinic (*vedi precedentemente*) e il Roswell Park regimen che prevede la somministrazione di 5FU 500 mg/m<sup>2</sup> e AF 500 mg/m<sup>2</sup> settimanale × 6 settimane, ripetuto ogni 8 settimane per 4 cicli non ha dimostrato particolari differenze in termini di efficacia, mentre ha evidenziato l'insorgenza di effetti avversi peculiari; nel primo più frequenti sono neutropenia e stomatite, nel secondo più frequente è l'insorgenza di diarrea.<sup>90</sup> Gli schemi che prevedono la somministrazione con infusione continua determinano l'insorgenza di minore tossicità ematologica e gastrointestinale e la comparsa della "handfoot syndrome" o sindrome mano piede: un rash eritematoso che coinvolge i palmi delle mani e le piante dei piedi. Il razionale dell'uso dell'infusione continua è legato all'osservazione che il farmaco ha un'emivita breve e quindi l'infusione protratta potrebbe aumentare il numero di cellule in fase S e quindi suscettibili al trattamento. La somministrazione in infusione continua oltre ad aumentare la percentuale di cellule suscettibili, consente di impiegare una più elevata intensità di dose senza incremento della tossicità; una metanalisi di 6 trial randomizzati ha evidenziato un modesto incremento del tasso di risposte e della sopravvivenza mediana tra i pazienti con mCRC che ricevono il 5FU infusione anziché in bolo.<sup>91</sup> Lo schema "ibrido" attualmente più impiegato prevede una combinazione di acido folinico, FU in bolo e FU in infusione da somministrarsi in 48 ore ogni 15 giorni. Riguardo ai pazienti con tumore in stadio II il QUASAR (QUick And Simple And Reliable) Colorectal Cancer Study Group ha condotto un importante trial 2 × 2, nel quale pazienti con CRC in stadio II e a basso rischio di ricorrenza, dopo intervento chirurgico radicale, sono stati randomizzati in due bracci di trattamento: sola osservazione vs chemioterapia con 5FU/AF. Lo studio ha valutato, in termini di OS, il vantaggio derivante dal

trattamento chemioterapico, nel gruppo di pazienti in cui lo stesso è scarsamente indicato. Nel braccio ricevente la chemioterapia, i pazienti sono stati trattati con 370 mg/m<sup>2</sup> di 5FU e randomizzati a ricevere LEV o placebo e basse (25 mg) o alte (175 mg) dosi di AF<sup>92</sup>. Il trattamento è stato somministrato quotidianamente per 5 giorni ogni 4 settimane, per una durata totale di 6 mesi, o una volta a settimana per 30 settimane. Dopo un follow up mediano di 5.5 anni lo studio ha evidenziato la riduzione del rischio di ricorrenza (hazard ratio [HR]=0.78, 95%CI 0.67-0.91, p=0.001) e di morte da qualsiasi causa (HR=0.82, 95%CI 0.70-0.95, p=0.008) nel braccio di trattamento chemioterapico. Nessuna differenza in OS è stata riscontrata tra il gruppo di trattamento ad alte dosi con AF e quello a basse dosi (71% vs 70% a 3 anni); sono emerse invece, una peggior sopravvivenza nel gruppo trattato con LEV che non con placebo (69.4% vs 71.5%; p=0.06) ed una minor tossicità in termini di stomatiti, diarrea e neutropenia nel braccio di trattamento settimanale. Uno studio fondamentale ha analizzato dati da 18 trials, in cui più di 20,800 pazienti con CRC in stadio II or III hanno ricevuto un trattamento adiuvante a base di 5-FU; le conclusioni hanno dimostrato come la chemioterapia adiuvante dia un beneficio significativo in OS e DFS. Il tasso di OS a 8 anni nei pazienti con CRC in stadio 3 trattati con sola chirurgia rispetto al gruppo trattato con una chemioterapia adiuvante a base di FU è rispettivamente del 42,7% (95%CI) e del 53% (95%CI) (p<0.0001); benefici in OS sono stati dimostrati anche nello stadio 2, rispettivamente 66,8% e 72,2% nei pazienti trattati con sola chirurgia e in quelli trattati con chemioterapia adiuvante (p=0.026).<sup>93</sup>

La capecitabina è un profarmaco del 5-FU a somministrazione orale che viene assorbito dalla mucosa gastrointestinale e selettivamente attivato a livello del tumore. Nel mCRC la sua azione terapeutica equivale nell'efficacia al 5-FU/LV<sup>94</sup>; nello studio X-ACT<sup>95</sup>1987 pazienti con CRC in stadio 3 sono stati randomizzati a ricevere capecitabina (1250 mg/m<sup>2</sup> di capecitabina due volte al giorno per 14 giorni ogni tre settimane) o 5-FU/LV (schema Mayo Clinic) per un periodo di 24 settimane; l'endpoint primario è stato la dimostrazione dell'equivalenza in termini di DSF dei 2 trattamenti, l'obiettivo primario per la sicurezza è stato l'incidenza di effetti tossici di grado 3 o 4 dovuti alle fluoropirimidine. I risultati hanno dimostrato come i pazienti trattati con capecitabina presentino una DFS equivalente a quella dei pazienti trattati con 5-FU (p<0.001); inoltre la capecitabina migliora la RFS (relapse free survival) (HR=0.86, 95%CI 0.74-0.99, p=0.04) e causa una minor incidenza di stomatite e neutropenia ma una più frequente insorgenza di iperbilirubinemia e sindrome mano-piede.

## ***REGIMI DI COMBINAZIONE***

### ***Oxaliplatino***

Studi successivi hanno dimostrato come l'aggiunta di oxaliplatino al trattamento con 5-FU e acido folinico migliori ulteriormente la probabilità di sopravvivenza a 5 anni e determini una riduzione relativa del rischio di recidiva. L'effetto dell'oxaliplatino è stato infatti valutato in pazienti con malattia metastatica in due studi di fase III che hanno dimostrato l'aumento del tasso di risposte e della DFS e un incremento dell'OS ottenuto grazie alla terapia con oxaliplatino associato a 5FU infusione e leucovorin.<sup>96</sup> Il "Multicenter International Study of Oxaliplatin/Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) ha valutato 2246 pazienti radicalmente operati in stadio II e III di malattia, randomizzati a ricevere 6 mesi di 5FU infusione e leucovorin associato o meno alla somministrazione di oxaliplatino.<sup>97</sup> Lo studio ha dimostrato che l'aggiunta di oxaliplatino, nel trattamento adiuvante di pazienti con CRC in stadio II o III, determina un miglioramento significativo sia della DFS a 5 anni, obiettivo primario, (73.3% vs 67.4%, p=0.003) che dell'OS a 6 anni (78.5% vs 76%; p=0.046). L'analisi per sottogruppi ha mostrato che mentre il vantaggio in OS a 6 anni risulta significativo nei pazienti con malattia in stadio III (72.9% vs 68.7%; p=0.023), non sembrano esserci differenze statisticamente rilevanti per i pazienti in stadio II.

Si può pertanto concludere che l'aggiunta di oxaliplatino a LV/5FU, come trattamento adiuvante del paziente con malattia in stadio II o III, aumenta significativamente la DFS a 5 anni e l'OS a 6 anni e che tale trattamento dovrebbe essere preso in considerazione dopo la chirurgia nei pazienti in stadio III.<sup>108</sup> Il profilo di tossicità della combinazione è risultato accettabile, con modesta tossicità ematologica ma con neuropatia manifesta nel 92% dei pazienti (12.5% di grado 3). L'aggiunta dell'oxaliplatino non è quindi scevra da effetti collaterali; in particolare nello studio MOSAIC il trattamento con FOLFOX causa neutropenia di grado 3 e 4 (41.1% vs 4.7%) e parestesia di grado 3 (12.4% vs 0.2%); dati analoghi sono riportati nello studio NSABP C 07 che ha randomizzato 2407 pazienti con mCRC in stadio II (29%) e stadio III (71%) a ricevere terapia adiuvante con 5FU/LV secondo lo schema Roswell Park in associazione o meno a oxaliplatino (85 mg/m<sup>2</sup> alla 1, 3 e 5 settimana di ogni ciclo da 8 settimane).<sup>99</sup> Dopo un follow up mediano di 34 mesi la DFS a 3 anni è risultata incrementata nei pazienti che ricevevano anche l'oxaliplatino (76.5% vs 71.6%, p=0.004), vantaggio molto simile a quello ottenuto con lo studio MOSAIC. Nello studio NSABP C-07 si ritrova inoltre una maggiore tossicità gastroenterica dovuta al regime in bolo di 5FU/LV in associazione all'oxaliplatino.

Un ulteriore studio di fase 3<sup>100</sup> ha randomizzato 1886 pazienti con CRC in stadio 3 a ricevere XELOX per 6 mesi (capecitabina 1000mg/m<sup>2</sup> e oxaliplatino 130mg/m<sup>2</sup> per 8 cicli) o 5-FU/LV per 6 mesi secondo lo schema Mayo Clinic o Roswell Park. Endpoint primario è stato la dimostrazione della superiorità in DFS del regime XELOX, obiettivi secondari sono stati la RFS, l'OS e la tollerabilità. Lo studio ha dimostrato una migliore DFS nei pazienti trattati con XELOX rispetto a quelli trattati con 5-FU/LV (HR=0.80, 95% CI 0.69-0.93, p=0.0045) e in assenza dei vantaggi in termini di OS (77.6% vs 74.2% rispettivamente; (HR=0.87, 95%CI 0.72-1.05, p=0.1486).

### ***Irinotecano***

L'utilizzo dell'irinotecano in terapia adiuvante è stato valutato sia nello studio randomizzato del Cancer Leukemia Group<sup>101</sup>, che nel "Pan European Trials in Adjuvant Colon Cancer 3 (PETACC3)<sup>102</sup>. Quest'ultimo studio è stato condotto su 2.094 pazienti in stadio III di malattia, randomizzati a ricevere LV5FU2 (LV 200 mg/m<sup>2</sup> in infusione di 2 ore, seguita da FU; 400 mg/m<sup>2</sup> e poi a 600 mg/m<sup>2</sup> in infusione continua per 22 ore, al giorno 1 e 2, ogni 2 settimane per 12 cicli: regime de Gramont) con o senza irinotecano (180 mg/m<sup>2</sup> in infusione di 30-90 minuti, al giorno 1, ogni 2 settimane). Dopo un follow-up mediano di 66.3 mesi, la DFS a 5 anni (obiettivo primario) è stata del 56.7% con irinotecano/LV5FU2 e 54.3% con solo LV5FU2. Il regime di combinazione non ha dato vantaggi in termini di OS ( tasso di sopravvivenza a 5 anni 73.6% vs 71.3%, rispettivamente; p=0.094). Inoltre l'aggiunta di irinotecano è stata associata ad una aumentata incidenza di neutropenia di grado 3 e 4. Dati analoghi sono stati ottenuti nello studio del Cancer Leukemia Group

### ***Farmaci biologici***

Un primo trial volto a investigare la sicurezza e l'efficacia dell'aggiunta del bevacizumab alla terapia adiuvante con FOLFOX6 in pazienti con CRC in stadio II e III è stato quello del "National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project" (NSABP-C08)<sup>103</sup>.

In questo studio di fase 3 i 2.672 pazienti randomizzati hanno ricevuto FOLFOX6 ogni 2 settimane per 26 settimane, da solo o con l'aggiunta di bevacizumab (5 mg/kg ogni 2 settimane per 52 settimane); l'endpoint primario è stato la DFS. I risultati hanno mostrato come l'aggiunta di bevacizumab a FOLFOX6 non incrementi significativamente la DFS (HR=0.89, 95%CI 0.76-1.04, p=0,15). Un ulteriore studio<sup>104</sup> di fase 3 ha randomizzato 3451 pazienti di cui 2867 con malattia in stadio III e 573 con tumore in stadio 2 ad alto rischio, che hanno ricevuto FOLFOX4; bevacizumab-FOLFOX4; bevacizumab-XELOX.



In seguito ad un follow-up mediano di 48 mesi, si è osservata recidiva di malattia o morte nel 25%, 29%, 27% dei pazienti rispettivamente nei 3 gruppi di trattamento. L' HR per la DFS del gruppo bevacizumab FOLFOX4 vs FOLFOX4 è stata di 1.17 (95%CI 0.98–1.39,  $p=0.07$ ), per bevacizumab–XELOX versus FOLFOX4 di 1.07 (95% CI 0.90–1.28;  $p=0.44$ ). Dopo un follow-up di 60 mesi, l'HR dell'OS per bevacizumab–FOLFOX4 versus FOLFOX4 è stata di 1.27 (1.03–1.57;  $p=0.02$ ), per bevacizumab–XELOX versus FOLFOX4 di 1.15 (0.93–1.42;  $p=0.21$ ). I 573 pazienti con CRC in stadio II ad alto rischio sono stati inoltre inclusi nell'analisi di sicurezza; il più comune evento avverso di grado 3/5 è stata la neutropenia (FOLFOX4: 42%, bevacizumab-FOLFOX4: 36% e bevacizumab–XELOX: 7%), a seguire la diarrea e l'ipertensione. Eventi avversi gravi sono stati più frequenti nel gruppo trattato con bevacizumab e nel gruppo bevacizumab–XELOX sono state più frequenti le morti correlate al trattamento. I Risultati che scaturiscono da questo trial evidenziano che il trattamento chemioterapico combinato con bevacizumab, attivo nel setting dei pazienti metastatici, non è efficace negli stadi più iniziali del CRC. Il bevacizumab infatti, se aggiunto al regime adiuvante non previene ulteriormente le recidive di malattia e non da un vantaggio aggiuntivo in OS.

Per ciò che concerne l'impiego di cetuximab in aggiunta al trattamento adiuvante, il trial PETAAC 8<sup>105</sup> ha confrontato la DFS, endpoint primario dello studio e l'OS, nei pazienti con CRC in stadio 3, radicalmente resecato, *KRAS* WT ed in terapia con FOLFOX4 più o meno cetuximab. Lo studio non ha riportato un vantaggio statisticamente significativo in DFS (75.1% FOLFOX4/cetuximab vs 78% solo FOLFOX4, HR=1.047, 95%CI 0.853-1.286,  $p=0.6562$ ) ed in OS (88.3% FOLFOX4/cetuximab vs 90.5% solo FOLFOX4, HR=1.092, 95%CI 0.813-1.466  $p=0.5583$ ) nel braccio dei pazienti trattati con il farmaco biologico, riportando, in quest'ultimo gruppo, un incremento di eventi avversi di grado 3/4. Da questi risultati si può concludere che l'aggiunta di cetuximab a FOLFOX4 non offre un vantaggio in DFS e OS nel setting di pazienti con un CRC in stadio 3 resecato, *KRAS* WT.

## Capitolo 2. Il trattamento della malattia metastatica

Nella gestione dei pazienti, le scelte del clinico devono tener conto dell'obiettivo che è ragionevole raggiungere con la terapia e che può variare sulla base delle caratteristiche del paziente e della neoplasia. Ad oggi infatti gli obiettivi perseguibili nel trattamento del mCRC possono essere la cura (possibile solo in un gruppo limitato di casi), il prolungamento della sopravvivenza, la palliazione dei sintomi, il miglioramento della qualità della vita, il ritardo della progressione della malattia e la risposta obiettiva al trattamento.

In questi ultimi due decenni la terapia del CRC in fase avanzata è radicalmente cambiata, prospettando soluzioni integrate, che si avvalgono di trattamenti sistemici chemioterapici (fluoropirimidine, oxaliplatino, irinotecan) trattamenti locali (chirurgia e radiofrequenze o radioterapia stereotassica) e farmaci biologici (bevacizumab, cetuximab). Per quanto riguarda la chemioterapia il farmaco cardine è stato ed è tuttora il 5FU, somministrato con tecnica infusione (vedi paragrafo precedente). Attualmente i regimi di combinazione che utilizzano irinotecan e oxaliplatino sono universalmente accettati come opzione terapeutica standard per il trattamento in prima linea del mCRC<sup>106,107</sup>, che non può prescindere dall'integrazione con i farmaci biologici. Tra i trattamenti locali la resezione chirurgica gioca un ruolo fondamentale perché rappresenta una concreta chance di cura nei pazienti con mCRC.<sup>108</sup>

Nell'ottica di caratterizzare la reseccabilità, la chemioresistenza e l'aggressività della malattia risulta imprescindibile la valutazione non solo delle caratteristiche cliniche del paziente, ma anche delle caratteristiche biologiche della malattia. Risulta quindi necessaria ai fini dell'orientamento della strategia terapeutica la caratterizzazione biomolecolare della neoplasia, con l'intento di identificare preliminarmente l'outcome dei pazienti, sia dal punto di vista di responsività al trattamento, sia dal punto di vista prognostico.

### 2.1 IL RUOLO DELLA TERAPIA CHIRURGICA

#### 2.1 a Il concetto di reseccabilità

Come accennato nel precedente paragrafo, la chirurgia epatica è un elemento fondamentale nel trattamento del mCRC. L'introduzione del concetto di "reseccabilità" delle metastasi ha reso l'opzione chirurgica proponibile anche nella malattia avanzata.

Nello specifico, la definizione di resecabilità e quindi le indicazioni per il trattamento chirurgico delle metastasi epatiche coloretali (CLM) sono state particolarmente dibattute ed oggetto di notevoli cambiamenti, data l'evidenza dei buoni risultati raggiungibili con una chemioterapia efficace in pazienti precedentemente incurabili<sup>109</sup>.

In primis fondamentale è la corretta stadiazione pre-operatoria della malattia, che scaturisce dall'integrazione di più tecniche diagnostiche, tra cui la RMN epatica rappresenta l'esame più sensibile e specifico in questo setting.<sup>110</sup> Imprescindibile nella valutazione della resecabilità dei secondarismi epatici, definita in base a criteri sia tecnici che oncologici, è la realizzabilità tecnica e la correttezza dell'indicazione oncologica; ciò presuppone che:

- sia possibile l'asportazione della massa tumorale con intento radicale (R0);
- il parenchima residuo sia ben vascolarizzato e con i sistemi di drenaggio venoso e biliare intatti;
- il fegato residuo sia in grado di assicurare una funzionalità epatocellulare sufficiente;
- almeno 2 segmenti epatici adiacenti possano essere risparmiati.<sup>111</sup>

Per determinare la fattibilità dell'intervento è quindi necessaria una valutazione da parte di un team specializzato nella chirurgia delle metastasi epatiche; tuttavia i singoli criteri chirurgici non sono sufficienti e devono essere integrati con criteri "oncologici" che tengano conto sia dell'inquadramento globale del paziente, del suo performance status e delle comorbidità associate, nonché della malattia stessa. A tale proposito, le caratteristiche della malattia possono essere oggettivate tramite opportuni score prognostici pre-operatori tra cui, il più frequentemente adottato è lo score di Fong i cui criteri di resecabilità delle metastasi epatiche includono:

- positività dei linfonodi
- intervallo libero da malattia dal tumore primitivo alla comparsa delle metastasi inferiore a 12 mesi
- tumore epatico di diametro maggiore di 5cm
- numero di lesioni epatiche maggiore di 1
- livelli di antigene carcino-embriionario (CEA) superiori a 200 ng/ml

Questo sistema di score pre-operatorio, assegna un punto per ognuna delle caratteristiche sopra specificate. Sulla base del punteggio è possibile distinguere pazienti a prognosi infausta che hanno score elevato da pazienti a buona prognosi che hanno score basso.<sup>112</sup>

Nei pazienti con uno score di 0, 1 o 2 la resezione chirurgica rappresenta indubbiamente un elemento terapeutico importante. Tuttavia la presenza di uno score elevato non esclude la possibilità di un intervento chirurgico, sebbene questo vada pianificato nel contesto più ampio di una strategia che includa una terapia medica. Ad esempio uno score di 5 non è una condizione che deve far escludere a priori la possibilità di ottenere una guarigione. A tale proposito, Tomlinson et al, hanno presentato uno studio retrospettivo<sup>108</sup> eseguito su pazienti sottoposti a resezione del CLM dal 1985-1994. Lo studio è stato eseguito su 612 pazienti, di cui il 17% dei pazienti era vivo a 10 anni. Lo studio ha inoltre evidenziato come i pazienti vivi a 10 anni dall'intervento di resezione delle CLM siano guariti dalla malattia, mostrando che, nei pazienti ben selezionati, vi è almeno una possibilità su sei di guarigione dopo epatectomia per CLM. Inoltre la presenza di fattori prognostici negativi (come malattia sincrona, intervallo libero da malattia inferiore a 12 mesi, metastasi bilobarie, linfonodi positivi, più di una metastasi, e dimensioni del tumore superiori a 5 cm) non esclude la possibilità di sopravvivenza a lungo termine e di cura.

### ***2.1b Tecniche chirurgiche sulle metastasi epatiche***

La chirurgia epatica con completa resezione delle metastasi ha marcatamente migliorato la sopravvivenza a 5 anni come dimostrato da numerosi studi<sup>113,114</sup>. Parallelamente, grazie al graduale miglioramento delle tecniche di imaging, affinamenti delle tecniche chirurgiche, e il continuo progresso nelle cure pre e post-operatorie, il tasso di mortalità post-operatoria dopo epatectomia è stato ridotto a meno del 3% .

Nessun trial randomizzato è mai stato eseguito per dimostrare che i pazienti con metastasi epatiche da CRC possano essere curati con la chirurgia epatica; tuttavia l'evidenza clinica suggerisce che il trattamento chirurgico possa spesso essere curativo. È stato infatti dimostrato che circa il 30% dei pazienti raggiungerà una sopravvivenza a 5 anni ed il 20% della popolazione raggiungerà una sopravvivenza tra 5 e 10 anni dopo la resezione delle metastasi<sup>115</sup>. Questo importante controllo della malattia non si osserva nei pazienti che non hanno ricevuto resezione chirurgica.<sup>116</sup> Sulla base di studi retrospettivi e comparativi, risulta quindi che la resezione epatica è l'unico trattamento disponibile che consenta la sopravvivenza a lungo termine.

Il tipo di intervento e la tempistica di esecuzione della chirurgia nei pazienti con metastasi epatiche da CRC sono strettamente legati alla sintomaticità del tumore primitivo, all'estensione della malattia metastatica e alle condizioni generali del paziente. Gli interventi di resezione epatica vengono classificati in base a criteri di ordine anatomico in resezioni cosiddette “tipiche” ed in resezioni “atipiche”. Le resezioni

epatiche tipiche vengono eseguite basandosi sui criteri di suddivisione anatomica funzionale del fegato. Tra queste resezioni sono comprese le epatectomie destre (resezione del parenchima epatico situato a destra della scissura portale principale, comprendente i segmenti 5, 6, 7, 8), le epatectomie sinistre (resezione del parenchima epatico sito a sinistra della scissura portale principale, comprendente i segmenti 2, 3, 4), le settoriectomie e le segmentectomie. Le tecniche chirurgiche per eseguire una resezione epatica tipica sono essenzialmente 2, la tecnica con controllo vascolare preventivo e la tecnica con sezione parenchimale immediata. La prima è stata descritta da Lortat-Jacob, poi ripresa da Couinaud e prevede il controllo preventivo della vena cava e dei vasi all'ilo; in tal modo si evita il sanguinamento massivo, ma si corre il rischio di devascularizzare eccessivamente il parenchima, data la frequente variazione anatomica nella disposizione dei vasi epatici. La seconda tecnica, descritta da Ton That Tung, prevede la resezione immediata del parenchima, mediante digitoclasia, seguita dall'emostasi, così da rendere possibile una resezione "à la demande" seguendo la variabilità anatomica vascolare. Un approccio alternativo è la resezione atipica (resezioni segmentarie, cuneiformi, "wedge resections"), ovvero una tecnica eseguita senza rispetto dei piani scissurali anatomici del fegato.

La realizzazione di resezioni anatomiche o non anatomiche rappresenta un argomento discusso già da molto tempo e al momento, nonostante la ricca letteratura sull'argomento, non esiste un reale consensus unanimemente accettato. La posizione recentemente più condivisa è che non vi sia una differenza significativa nella sopravvivenza a distanza dipendente dalla procedura chirurgica effettuata; inoltre è ritenuto che resezioni epatiche anatomiche non siano superiori alle wedge resections in termini di incidenza di margini positivi, recidiva e OS.<sup>117</sup> Un approccio alternativo, utile nelle situazioni di malattia così estesa da non permettere un'unica resezione, è quello di raggiungere in 2 fasi una resezione completa delle metastasi epatiche inizialmente considerate non operabili (two-stage hepatectomy); tale intervento consiste in una prima resezione, funzionale alla riduzione del carico metastatico del lobo epatico interessato, un intervallo tra le due procedure chirurgiche di circa 4 mesi, tale da consentire al fegato residuo di rigenerarsi, ed infine una seconda epatectomia con finalità curative. Nella prima procedura viene quindi asportato il maggior quantitativo di tessuto tumorale possibile nel rispetto della funzionalità epatica residua, mentre nella seconda viene bonificato il restante parenchima epatico; tuttavia è anche possibile bonificare per primo il lobo meno coinvolto (soprattutto in caso di metastasi sincrone), rinviando l'epatectomia maggiore al secondo tempo.

## 2.2 IL RUOLO DELLA TERAPIA MEDICA

Come già accennato nel paragrafo precedente, dal punto di vista oncologico il concetto di resecabilità è particolarmente complesso e richiede la valutazione di molti aspetti, sia clinici che biologici della malattia. Ciononostante vi è tra gli esperti un certo accordo nel distinguere almeno tre possibili categorie di pazienti:

- *pazienti con metastasi resecabili*
- *pazienti con metastasi marginalmente o potenzialmente resecabili*
- *pazienti con metastasi mai resecabili*

L'appartenenza a ciascuno di questi gruppi condiziona profondamente la strategia di trattamento e lo scopo che con esso è possibile perseguire. Nei pazienti con metastasi resecabili la chirurgia ha un intento curativo e la chemioterapia si inserisce nella strategia terapeutica a scopo essenzialmente adiuvante. Nei pazienti potenzialmente o marginalmente resecabili la terapia medica ha il ruolo di rendere elegibile il paziente per una chirurgia con intento curativo. Infine nei pazienti non resecabili lo scopo della terapia medica sarà quello di prolungare la sopravvivenza e la qualità della vita.

Rimane ad ogni modo da considerare che determinare l'appartenenza di un paziente ad una delle categorie sopracitate è spesso difficile in quanto la definizione di resecabilità è basata non solo su criteri oggettivi, ma anche sulla capacità ed esperienza di ogni team.

### ***2.2a Pazienti con metastasi resecabili***

Esiste un 15% circa di pazienti metastatici “facilmente resecabili” ovvero con adeguati margini radiologici, assenza di coinvolgimento di linfonodi portali ed interessamento epatico limitato (fino a 4 lesioni confinate ad un unico lobo).

In questo gruppo di pazienti l'intento della chirurgia è curativo e la chemioterapia, basata su un trattamento peri-operatorio o post-operatorio con FOLFOX (5FU e oxaliplatino) o XELOX (capecitabina ed oxaliplatino) aggiunge un beneficio in termini di sopravvivenza libera da malattia. Un approccio chemioterapico peri-operatorio ha lo scopo di trattare precocemente le micro metastasi, valutare preoperatoriamente la chemioresponsività, individuare malattie particolarmente aggressive e prolungare la DFS.

L'efficacia della terapia “adiuvante” è stata dimostrata in uno studio randomizzato di fase III<sup>118</sup>, in cui pazienti sottoposti a resezione chirurgica delle metastasi epatiche sono stati randomizzati a ricevere o meno 5FU/LV per 6 mesi dopo la chirurgia. La DFS mediana, obiettivo primario dello studio, nei pazienti non trattati è risultata di 17.6 vs 24.4 mesi nei

pazienti trattati (HR=0.66, 95%CI 0.46-0.96, p=0.028), l'OS di 46.4 vs 62.1 mesi, rispettivamente nei due gruppi (HR=0.73, 95%CI 0.48-1.10, p=0.13).

Lo studio di fase III dell'European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Intergroup 40983, ha confrontato la sola chirurgia con un trattamento perioperatorio (pre e post-operatorio, 12 cicli complessivi) con FOLFOX. Obiettivo primario dello studio è stata la DFS<sup>119</sup>. La resezione è stata possibile nel 87.4% dei pazienti sottoposti a chemioterapia vs 97.3% dell'altro braccio, ma il tasso di resezioni complete è risultato sovrapponibile (83.5% vs 83.0%), con un leggero aumento di complicanze postoperatorie nel braccio con chemioterapia, senza aumento di mortalità postchirurgica. La DFS ha mostrato un trend di aumento nella popolazione di pazienti randomizzati (HR=0.79, 95%CI 0.62-1.02, p=0.058), mentre considerando solo i pazienti eleggibili (HR=0.77, 95%CI 0.60-1.00, p=0.041) o tutti pazienti con resezione R0 (HR=0.72, 95%CI 0.55-0.97, p=0.025) la differenza in termini di DFS è risultata significativa.

### ***2.2b Pazienti con metastasi marginalmente o potenzialmente resecabili***

Il 35% di pazienti con mCRC è definibile come “borderline” o “potenzialmente resecabile”, due condizioni che devono essere distinte; del primo gruppo fanno parte pazienti con uno o più fattori prognostici negativi come la presenza di metastasi in numero superiore a quattro, margini radiologicamente inadeguati, interessamento linfonodale ed in generale, una condizione in cui l'intervento chirurgico è possibile, seppur gravato da un altissimo rischio di ripresa di malattia. Del gruppo di pazienti “potenzialmente resecabili” fanno parte quei casi in cui l'intervento non è immediatamente fattibile perché la lesione è troppo estesa o le lesioni sono troppo numerose, ma tuttavia l'estensione non è tale da escludere completamente la possibilità di una resezione con intento radicale dopo l'eventuale ottenimento di una risposta alla terapia medica. In entrambi i sottogruppi una terapia sistemica particolarmente attiva può portare alla fattibilità di una resezione radicale, quindi risulta fondamentale impostare rapidamente un trattamento tale da garantire la massima probabilità di riduzione del tumore, in quanto è dimostrata una correlazione diretta tra il tasso di risposta alla chemioterapia di prima linea e il tasso di resezioni radicali postchemioterapia.<sup>120</sup> Questa relazione è stata dimostrata sia in trials che hanno incluso pazienti con sola malattia epatica ( $r^2=0.96$ ,  $p=0.002$ ) sia in trials che hanno arruolato pazienti non selezionati ( $r^2=0.74$ ,  $p<0.001$ ).

La superiorità di una chemioterapia basata su doppiette rispetto all'uso del singolo 5FU è stata dimostrata in una serie di studi randomizzati; i regimi a base di 5FU e irinotecano hanno dimostrato un tasso di risposta (RR) compreso tra il 39%<sup>121</sup> ed il 49%<sup>122</sup>. Anche l'oxaliplatino in combinazione rispetto al solo 5FU/LV ha mostrato un RR circa due volte maggiore rispetto a quello ottenuto nel braccio con solo 5FU/LV (RR:34% vs 13%; p=0.0001)<sup>107</sup>.

L'equivalenza di attività tra i due schemi (FOLFOX4 e FOLFIRI) in prima linea, è stata dimostrata da 2 studi, uno italiano ed uno francese. Lo studio italiano di fase III<sup>123</sup> ha dimostrato un overall response rate (ORR) sovrapponibile nei pazienti trattati con FOLFIRI ed in quelli trattati con FOLFOX (31% nel primo braccio vs 34% nel secondo, p=0.60). Risultati analoghi che hanno portato a considerare le doppiette sostanzialmente equivalenti nel setting di conversione derivano dallo studio francese del Groupe Cooperateur Multidisciplinaire en Oncologie<sup>124</sup>(GERCOR).

Sulla base di queste considerazioni ed allo scopo di migliorare l'attività dei regimi convenzionali di trattamento di prima linea, Falcone e coll hanno condotto, alla fine degli anni '90, uno studio di fase I-II per valutare l'attività di un regime chemioterapico a base di irinotecano, oxaliplatino e 5FU in infusione cronomodulata;<sup>125</sup> a questa esperienza preliminare ha poi fatto seguito un ulteriore studio di fase II in cui è stato sviluppato un regime di associazione semplificato con la tripletta (FOLFOXIRI)<sup>126</sup>. Lo studio pilota ha arruolato 42 pazienti, di cui 11 sono stati sottoposti a resezione della malattia residua; il trattamento ha dimostrato di avere tossicità accettabili e maneggevoli, sono state osservate una PFS e una OS rispettivamente di 10.4 e 26.5 mesi. Nello studio di fase II è stato riportato un RR del 72% (95%CI 0.53-0.86), un tasso di resezione radicale delle metastasi post chemioterapia del 25% e dopo un follow up mediano di 18.1 mesi, una PFS mediana di 10.8 mesi e una OS mediana di 28.4 mesi. L'analisi combinata di entrambi gli studi ha dimostrato inoltre che nel 26% dei pazienti è stato possibile effettuare dopo la chemioterapia una resezione secondaria R0 da sola (16%) o associata a RFA (10%) della malattia residua<sup>127</sup>, permettendo di ottenere, nei pazienti resecati, un tasso di sopravvivenza a 4 anni del 37%.

Partendo da questi risultati il Gruppo Oncologico Nord Ovest (G.O.N.O.) ha messo a confronto, in uno studio multicentrico di fase III, il regime semplificato di FOLFOXIRI con il regime standard FOLFIRI, arruolando 244 pazienti con CRC e metastasi inizialmente non reseccabili.<sup>128</sup>

Il trattamento con la tripletta ha portato ad un RR del 66% vs 41% del braccio di controllo con solo FOLFIRI (p=0.002) e ad un maggior numero di resezioni radicali delle



metastasi (15% vs 6%;  $p=0.033$ ); nei pazienti con metastasi confinate al fegato il tasso di resezioni R0 è risultato del 36% per la tripletta vs 12% per la doppietta. Anche all'analisi multivariata è stato confermato il ruolo determinante della tripletta nel condurre a resezioni R0 (HR=3.1, 95%CI 1.2-7.9,  $p=0.018$ ). E' stato osservato inoltre un aumento della PFS (9.8 vs 6.9 mesi; HR=0.63,  $p=0.006$ ) e dell'OS (22.6 vs 16.7; HR=0.70,  $p=0.032$ ), a costo di un aumento della neurotossicità di grado 2-3 (19% vs 0%;  $p<0.001$ ) e della neutropenia di grado 3/4 ( 50% vs 28%;  $p<0.001$ ).

Una nuova analisi retrospettiva condotta sui 196 pazienti trattati nell'ambito dei tre studi citati con il regime FOLFOXIRI, ha mostrato che il 19% dei pazienti sono successivamente andati incontro a chirurgia secondaria R0 (+/-RFA) sulle metastasi (tale percentuale saliva al 34% considerando pazienti con malattia confinata al fegato). Dopo un follow up mediano di 67 mesi la sopravvivenza a 5 e 8 anni era rispettivamente del 42% e 33%.<sup>129</sup>

Con l'avvento dei farmaci biologici si è riproposta la questione del miglior regime da utilizzare nei pazienti potenzialmente o marginalmente resecabili. Bevacizumab in combinazione con schemi contenenti irinotecano determina un tasso di risposte compreso tra il 45 e il 58% con un tasso di resezioni R0 del 5% nella popolazione generale, che sale all'11,7% nei pazienti con malattia metastatica confinata al fegato. Con i regimi a base di oxaliplatino, bevacizumab permette di ottenere un tasso di risposte che va dal 38 al 73% ed una chirurgia radicale sulle metastasi inizialmente non resecabili nell'8% dei casi che arriva al 15,4% nei pazienti con sole metastasi epatiche. L'attività di FOLFOXIRI in associazione a bevacizumab è stata valutata nel trial di fase 2 FOIB<sup>130</sup>. Nei 57 pazienti trattati è stato osservato un RR del 77%, con un tasso di controllo di malattia del 100% ed un 26% di pazienti sottoposti a chirurgia secondaria radicale. Sulla base dei risultati ottenuti nell'ambito dello studio FOIB, è stato condotto uno studio di fase III in cui l'associazione di bevacizumab al regime FOLFOXIRI è stata confrontata con il regime standard FOLFIRI e bevacizumab in pazienti con mCRC non resecabile in prima linea di trattamento<sup>131</sup>. Sono stati randomizzati 508 pazienti, 256 e 252 nei due bracci rispettivamente. Obiettivo primario dello studio è stata la PFS, tra gli endpoints secondari RR, il tasso di resezioni radicali e OS. Lo studio ha dimostrato come il regime FOLFOXIRI e bevacizumab riduca significativamente il rischio di progressione (HR=0.77,  $p=0.006$ ) e aumenti significativamente il RR (65% vs 53%,  $p=0.005$ ), a prezzo di un incremento delle tossicità gastrointestinali (diarrea e stomatite) ed ematologiche (neutropenia). Dati preliminari suggeriscono un beneficio anche in termini di OS, ma al momento l'analisi non ha sufficiente potere statistico per definire eventuali differenze in

termini di OS<sup>132</sup>. Sulla base di tali risultati è possibile affermare che FOLFOXIRI in associazione a bevacizumab possa rappresentare un nuovo standard per il trattamento di prima linea in pazienti con mCRC.

L'efficacia di FOLFOXIRI e bevacizumab, come regime capace di indurre un elevato tasso di resezioni, è stato valutato anche in un trial randomizzato di fase 2<sup>133</sup> che ha arruolato 80 pazienti con mCRC e lesioni esclusivamente epatiche, definiti non resecabili in accordo a criteri chirurgici prestabiliti. I pazienti hanno ricevuto FOLFOXIRI e bevacizumab (41 pazienti) o FOLFOX e bevacizumab (39 pazienti). I dati mostrano come il regime sperimentale dia un vantaggio in termini di resezioni (61% vs 48.7%), tasso di risposte (80.5% vs 61.5%) e PFS (18.8 mesi vs 12 mesi).

Gli anticorpi anti-EGFR (cetuximab e panitumumab) sono approvati per il trattamento nei pazienti *KRAS* wt. Lo studio di fase III CRYSTAL<sup>134</sup> ha randomizzato 1198 pazienti a ricevere FOLFIRI in associazione o meno a cetuximab. La PFS, endpoint primario dello studio, è risultata significativamente maggiore nel braccio con cetuximab (9.9 mesi vs 8.4 mesi, HR=0.696, p=0.0012). In termini di OS è stata registrata una differenza statisticamente significativa tra i 2 bracci (23.5 mesi nel braccio con cetuximab vs 20 mesi, HR=0.796, p=0.0093). Lo studio OPUS<sup>135</sup> di fase II, ha valutato l'attività di FOLFOX4 più o meno cetuximab, nel trattamento di I linea in pazienti con mCRC. Il tasso di risposte, endpoint primario, nel braccio sperimentale è del 46%, nel braccio di controllo risulta 36% (OR=1.52, p=0.064) la PFS mediana sia nel gruppo sperimentale che nel controllo è 7.2 mesi.

Dati preliminari mostrano come l'aggiunta di un anti-EGFR a regimi intensivi a 3 farmaci, come FOLFOXIRI, determini alti tassi di risposte e resezioni. Questo genere di osservazioni sono state confermate da diverse piccole esperienze di fase 2, come il trial prospettico di fase 2 POCHER<sup>136</sup>, lo studio di fase 2 ERBIRINOX<sup>137</sup>, e il trial di fase 1 e 2 condotto da Folprecht e al.<sup>138</sup>. Tra queste, lo studio di fase 2 TRIP<sup>139</sup> condotto dal gruppo GONO ha valutato l'attività di FOLFOXIRI in associazione a panitumumab in una popolazione di 35 pazienti *KRAS/BRAF/NRAS/HRAS* wild type e con mCRC non resecabile; i risultati del trial sono stati promettenti con un tasso di risposta ed un tasso di resezione radicale dell'86% e 24%, rispettivamente.

### ***2.2c Pazienti con metastasi “mai” resecabili***

Esiste infine un 50% di pazienti metastatici in cui l'obiettivo del trattamento è volto al prolungamento della sopravvivenza, alla cura dei sintomi correlati ed al mantenimento di una buona qualità della vita. La resezione delle metastasi epatiche in questo setting di

pazienti non è tuttavia da escludersi in quanto, in casi eccezionali a seguito di grandi benefici dalla terapia medica, approcci chirurgici secondari possono essere perseguibili. D'altra parte, nella maggioranza dei casi, la terapia è finalizzata alla palliazione dei sintomi e al rallentamento della progressione tumorale.

Nel gruppo di pazienti "mai" resecabili è fondamentale la valutazione dell'aggressività di malattia, utilizzando come fattori prognostici principali l'età, il PS, l'analisi della mutazione *BRAF*, la modalità di comparsa delle metastasi (sincrone o metacrone), il numero di sedi della malattia;<sup>140</sup> a questi si aggiungono elementi minori quali ad esempio livelli di emoglobina, LDH e CEA.

Quindi, sulla base delle caratteristiche della malattia, possiamo suddividere questo gruppo di pazienti in:

A) Pazienti con malattia diffusa/aggressiva sintomatica e mai operabili per estensione di malattia o con deterioramento del PS dovuto alla malattia o entrambe le caratteristiche

B) Pazienti non operabili con malattia diffusa/indolente e senza il deterioramento del PS dovuto a malattia

*A)Pazienti con malattia diffusa/aggressiva e mai operabili per estensione di malattia o con deterioramento del PS dovuto alla malattia o entrambe le caratteristiche*

Nei pazienti senza chance chirurgiche e con malattia aggressiva può essere impiegato un regime di trattamento intensivo, che integri chemioterapia e farmaci biologici, al fine di raggiungere un buon controllo di malattia. Lo studio TRIBE mostra infatti come un approccio terapeutico intensivo in prima linea, associato ad un importante "shrinkage" tumorale possa avere un impatto favorevole sulla successiva PFS e OS anche nel setting palliativo, in cui quindi sono valide le considerazioni del paragrafo precedente.

A conferma di quanto affermato, Golberg e coll.<sup>141</sup> hanno dimostrato che nonostante un PS 2 sia un fattore prognostico negativo, tale condizione non influenza il beneficio ottenuto con le terapie di combinazione. In particolare, le doppiette con 5FU infusionale e oxaliplatino o irinotecano confrontate con il trattamento con 5FU in monochemioterapia hanno mostrato una maggiore attività in tutti i soggetti trattati, ma i pazienti con PS 2 ne hanno tratto un beneficio relativo analogo o addirittura maggiore (pazienti PS 0-1 PFS 8.7 mesi vs 6.3 mesi HR=0.72, 95%CI 0.67-0.77, p<0.0001; pazienti PS 2 PFS 6.9 mesi vs 3.2 mesi, HR=0.64; 95%CI 0.50-0.81, p<0.0003; all'analisi di interazione p=0.039) a prezzo di un incremento di nausea, vomito e mortalità a 60 giorni. Grothey e coll.<sup>142</sup>

hanno valutato l'effetto della terapia di combinazione più aggressiva in prima linea nei pazienti che a causa del cattivo PS o dell' aggressività di malattia avranno poche possibilità di ricevere un trattamento di seconda linea, dimostrando come anche in questo gruppo sia preferibile una terapia di combinazione, così da beneficiare degli effetti dei tre farmaci più attivi contemporaneamente.

*B)Pazienti non operabili con malattia diffusa/indolente e senza deterioramento del PS dovuto alla malattia*

L'obiettivo primario della terapia in questo caso è di prolungare il più possibile la sopravvivenza senza compromettere la qualità di vita, posticipando la comparsa della fase sintomatica e non esponendo i pazienti a tossicità inutili.

I trial FOCUS<sup>143</sup> e CAIRO<sup>144</sup> hanno mostrato che in questi gruppi selezionati di pazienti le strategie che utilizzano un singolo farmaco in prima linea, seguito poi da una doppietta, non sono inferiori in termini di OS a strategie che utilizzano la doppietta in prima linea.

Sulla base di questi dati gli autori hanno proposto che nel setting non curativo in prima linea venga utilizzato il trattamento più tollerabile, l'approccio sequenziale con la doppietta in prima o seconda linea sono entrambi validi e possono essere proposti al paziente.

Recenti dati pubblicati dal trial FFOCD 2000-05, confrontano il regime di 5-FU in prima linea, seguito da FOLFOX in seconda linea e FOLFIRI in terza linea con lo schema FOLFOX e FOLFIRI rispettivamente in prima e seconda linea; i risultati di tale studio sono sovrapponibili a quelli ottenuti nei trials FOCUS<sup>143</sup> e CAIRO<sup>144</sup>. Tuttavia nonostante i sopracitati trials mostrino come le monochemioterapie, seguite da doppiette, non siano inferiori in termini di OS a doppiette in prima linea, ad oggi il trattamento più frequentemente adottato è proprio la doppietta in prima linea, sebbene strategie meno aggressive possano essere valide alternative percorribili in casi selezionati. In particolare, attualmente la scelta di una monochemioterapia dovrebbe essere dettata più dalle comorbidità del paziente e dalle sue condizioni generali, piuttosto che da una strategia terapeutica prestabilita. Certamente anche in questo setting l'utilizzo dei farmaci biologici è ad oggi imprescindibile. La dimostrazione formale di tale affermazione deriva dai risultati di una metanalisi<sup>145</sup> che ha valutato 5 trials randomizzati inerenti l'uso di bevacizumab in pazienti con mCRC. Nel confronto tra la chemioterapia di prima linea con o senza bevacizumab, l' HR totale per la PFS (0.61, 95%CI 0.45-0.83) e per l'OS (0.81, 95%CI 0.73-0.90) ha confermato un beneficio significativo nel gruppo di pazienti trattati con il farmaco anti-angiogenico, a prezzo di una maggior incidenza di ipertensione

di grado 3/4, eventi tromboembolici e perforazioni gastro-intestinali. Tuttavia gli effetti sulla PFS hanno mostrato una importante eterogeneità. Per la chemioterapia di seconda linea in un unico trial è stato dimostrato un vantaggio sia in termini di OS (HR=0.75 95%CI 0.63-0.89) che di PFS (HR=0.61 95%CI 0.63-0.89).

L'aggiunta di bevacizumab alla monochimioterapia con capecitabina è supportata dai risultati dello studio di fase 3 MAX<sup>146</sup>, che ha riportato un vantaggio significativo in PFS, endpoint primario, conseguente all'aggiunta del farmaco antiangiogenico alla capecitabina (HR=0.63, 95%CI 0.50–0.79, p<0.001). Nello studio di fase 3 AVEX<sup>147</sup> è stato valutato prospettivamente l'uso di bevacizumab in pazienti con mCRC ed età superiore a 70 anni. Il trial ha randomizzato 280 pazienti, mostrando come l'aggiunta di bevacizumab alla capecitabina migliori significativamente la PFS ( 9,1 vs 5,1 mesi HR=0,53, p<0,01) e l'ORR (19,3% vs 10% p=0.042) rispetto al regime con sola capecitabina; è stata inoltre osservato un vantaggio in OS nel braccio trattato con bevacizumab, tuttavia tale dato non è risultato statisticamente significativo. Lo studio AVEX ha quindi dimostrato come la combinazione di capecitabina e bevacizumab in pazienti di età superiore a 70 anni sia efficace e ben tollerata.

## Capitolo 3 Il ruolo della caratterizzazione biomolecolare

Negli ultimi anni si è assistito ad una rapida evoluzione delle strategie di trattamento del mCRC, che hanno condotto a risultati significativi in termini di risposta al trattamento e sopravvivenza. Nello specifico, la disponibilità di nuovi farmaci biologici ad attività target ha significativamente migliorato la prognosi dei pazienti; tuttavia analisi volte a valutare l'efficacia degli anti-EGFR hanno mostrato come solo alcuni dei pazienti trattati ricevano un reale beneficio dalla somministrazione del farmaco. In questo contesto la mutazione di *KRAS* è emersa come un determinante fattore predittivo negativo di risposta agli anti-EGFR: i pazienti *KRAS* mutati infatti non rispondono a questa categoria di farmaci. Anche i *BRAF* mutati hanno una scarsissima probabilità di risposta alla terapia biologica, sebbene per molte ragioni, prima tra tutte la rarità di questa condizione, il ruolo predittivo di *BRAF* non sia definitivamente provato. Oltre alle considerazioni inerenti il valore predittivo, ci si è chiesti come queste mutazioni siano legate a condizioni cliniche peculiari (*vedi successivamente*), con un ruolo prognostico negativo per entrambe, sebbene per i *BRAF* mutati tale valenza sia più chiara e forte.

Nel CRC le mutazioni di *BRAF* hanno un'incidenza nettamente inferiore rispetto a quella rilevata per le mutazioni di *KRAS*. Tali mutazioni, nella quasi totalità dei casi, sono limitate alla V600E e sono state descritte con una percentuale che può variare dal 5-15%.<sup>148</sup> Le mutazioni di *KRAS* e di *BRAF* sono eventi mutualmente esclusivi infatti, meno dell'1% dei casi mutati per *BRAF* risultano essere mutati anche per *KRAS*.

### 3.1 *KRAS* e *BRAF*: CENNI DI BIOLOGIA MOLECOLARE

La cascata Ras-Raf-MAPK è una via di trasduzione che riveste un ruolo di estrema importanza nel controllo della proliferazione e sopravvivenza cellulare. Questa sequenza di eventi molecolari viene indotta da un segnale extracellulare, che può essere rappresentato da fattori di crescita di varia natura, riconosciuti da opportuni recettori di membrana appartenenti alla famiglia dei recettori tirosina-kinasi (GFR, Growth Factor Receptor), tra i quali il recettore per il fattore di crescita epiteliale EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). EGFR è il capostipite di una famiglia di recettori (ErbB) comprendente 4 membri: EGFR (Erb1 o HER1), Erb2 (HER2 o neu), Erb3 (HER3) e Erb4 (HER4). La principale caratteristica di questa famiglia recettoriale è, come sopra accennato, l'attività tirosin-chinasica (TK), ovvero la capacità di fosforilare i residui di tirosina situati nella porzione intracellulare del recettore stesso, attivando così una serie di

eventi che conducono all'attivazione intranucleare di specifici geni implicati nella regolazione e proliferazione cellulare. Specifici ligandi, interagendo con il dominio extracellulare del recettore, inducono la dimerizzazione dello stesso; la porzione intracellulare del recettore va quindi ad autofosforilare residui di tirosina i quali, una volta fosforilati, costituiscono un punto di attacco per il gruppo SH2 delle proteine adattatrici Grb2 e Sos. Quest'ultime reclutano i fattori GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) in grado di attivare la proteina Ras. La proteina Ras, nella sua forma attiva, può fosforilare le proteine della famiglia Raf, effettori importanti della cascata, che, a loro volta, fosforilano tutta una serie di proteine chinasi, le MAPkinasi, capaci di traslocare nel nucleo e promuovere la trascrizione di geni che consentiranno alla cellula di rispondere al segnale iniziale. In particolare vengono fosforilati fattori di trascrizione che determinano la produzione di nuovi mRNA; quest'ultimi codificano per proteine che coordinano un'ampia varietà di risposte cellulari coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare, nella proliferazione e differenziazione cellulare, nella sopravvivenza, nell'apoptosi ed in molti altri processi cellulari.<sup>149</sup>

Alterazioni della via di trasduzione del segnale Ras-Raf-MAPK hanno un ruolo chiave nella regolazione dei diversi processi biologici implicati nella cancerogenesi. In particolare l'overespressione e/o l'attivazione incontrollata dei componenti di tale via contribuisce alle fasi di iniziazione, progressione e metastatizzazione delle cellule tumorali, guidando i meccanismi di resistenza all'apoptosi, la proliferazione cellulare, l'angiogenesi, la migrazione cellulare e l'invasione tissutale. I componenti che fanno parte di tale cascata di trasduzione del segnale maggiormente coinvolti nella tumorigenesi dei CRC sono i geni della famiglia Ras, prevalentemente *KRAS*, e quelli della famiglia Raf, prevalentemente *BRAF*. Infatti, la presenza di mutazioni in tali geni determina un incremento dei livelli di trascrizione di oncogeni quali *myc*, *fos* e *jun*, responsabili di una crescita cellulare incontrollata.

La famiglia delle proteine Ras comprende un gruppo di proteine monomeriche associate alla membrana plasmatica, caratterizzate da un peso molecolare di 21 kDa e da un'attività GTPasica intrinseca. I principali componenti della famiglia Ras sono rappresentati dalle proteine *HRAS*, *KRAS* e *NRAS*, codificate dai geni *Ras* localizzati sui cromosomi 11, 12 e 1 rispettivamente. Le proteine Ras possono esistere in due conformazioni diverse: quella legata al GDP in cui la proteina è nel suo stato inattivo o la forma attiva, in cui la proteina è legata al GTP.<sup>150</sup> Il cambiamento conformazionale tramite lo scambio GDP/GTP determina l'attivazione della proteina Ras, la quale, una volta attivata, è in grado di svolgere la sua funzione di controllo cellulare mediante la fosforilazione di numerosi

effettori, tra cui la proteina *BRAF*. Il segnale si interrompe quando il GTP è idrolizzato a GDP grazie all'attività GTPasica intrinseca della proteina Ras e alla proteina GAP che promuove tale attività.

In condizioni fisiologiche questo equilibrio è strettamente regolato ma, in condizioni di alterazione di uno o più componenti del sistema, può crearsi un squilibrio tale da indurre processi implicati nella cancerogenesi. Le mutazioni di Ras “attivanti” rendono la proteina costitutivamente attiva, determinando una stimolazione continua delle tappe molecolari a valle di Ras, in particolare della via delle MAPK. L’attivazione costitutiva della via di segnale delle MAPK, conduce quindi ad una spinta proliferativa indipendente dall’attivazione di EGFR, assumendo così un ruolo chiave nella cancerogenesi del CRC.<sup>151</sup> Il 50% dei casi di CRC sporadico presenta mutazioni a carico del gene *KRAS*.<sup>152</sup> Le mutazioni fino ad ora descritte sono mutazioni somatiche puntiformi a carico dei codoni 12 e 13 dell’esone 2 e dei codoni 59/61 e 117/146 rispettivamente dell’esone 3 e 4. Tali mutazioni hanno una diversa frequenza (il codone più frequentemente mutato è infatti il 12). E’ stato inoltre osservato che nel CRC il tipo di mutazione più frequente del gene *KRAS* è rappresentato dalla sostituzione di una base nucleotidica guanina con un’adenina (transizione G>A) oppure con una timina (transversione G>T) sul codone 12.<sup>153</sup>

Il gene *RAF*, è situato sul cromosoma 7 in posizione 7q34. In seguito ad un complesso fenomeno di splicing alternativo si originano tre diverse molecole di mRNA maturo, la cui traduzione condurrà a tre isoforme alternative di *RAF* ovvero A-*RAF*, B-*RAF* e C-*RAF*. *BRAF* codifica per una serina/treonina chinasi che agisce come effettore a valle rispetto a *KRAS*.<sup>154</sup> L’attivazione della proteina *BRAF* avviene per opera di processi di fosforilazione multipli. In questa proteina, infatti, sono stati identificati due principali siti di fosforilazione, il residuo aminoacidico di treonina in posizione 599 e quello di serina in posizione 602, i quali sono localizzati in prossimità del segmento di attivazione del dominio chinasi ed hanno un ruolo critico nell’attivazione della proteina stessa. Tali siti di fosforilazione sono essenziali per garantire il corretto funzionamento della proteina in quanto, se alterati, possono compromettere l’intera regolazione della via di trasduzione e promuovere quindi i processi cellulari che guidano la cancerogenesi.

In seguito all’attivazione della proteina *BRAF*, si osserva un meccanismo di fosforilazioni a cascata delle proteine MEK1 e MEK2, le quali a loro volta fosforilano ed attivano ERK1 ed ERK2. Queste due proteine promuovono la trascrizione genica, attivando, mediante meccanismi di fosforilazione, un ampio numero di fattori di trascrizione e di



chinasi. Sebbene siano descritte più di 40 mutazioni nel dominio kinasico di *BRAF*<sup>155</sup>, la più comune mutazione è la classica sostituzione GTG-GAG in posizione 1799 dell'esone 15, che risulta nella mutazione dell'aminoacido V600E. Tale mutazione consiste in una transversione di una timina con un'adenina (T>A) in posizione 1799 che determina la sostituzione a livello del codone 600 della proteina di un residuo aminoacidico di valina (V) con un acido glutammico (E). L'inserimento del glutammato, carico negativamente, conferisce una carica negativa in grado di mimare la fosforilazione dei residui di treonina 599 e serina 602, conducendo quindi all'attivazione della proteina *BRAF*. Le mutazioni di *BRAF* attivano costitutivamente questa kinasi, mimando la fosforilazione *RAS*-indotta e promuovendo quindi la crescita, la sopravvivenza e l'angiogenesi delle cellule tumorali. Oltre alla mutazione V600E, però, nei CRC sono state descritte anche altre mutazioni a carico del gene *BRAF* che sono estremamente rare e coinvolgono aminoacidi posizionati in prossimità del sito tirosino-kinasico, o del dominio della proteina ricco di residui di glicina, nelle regioni adiacenti al codone 600, quali: D594G, L597Q e G1406C. In dettaglio la mutazione D594G risulta in un cambiamento aminoacidico a livello del codone 594 della proteina che determina la sostituzione di un residuo di glicina con uno di acido aspartico; la mutazione L597Q consiste, invece, nella sostituzione, a livello della proteina, di una leucina con un residuo di glutamina, mentre la mutazione G1406C determina l'inserimento di una cisteina al posto di un residuo di glicina.

### 3.2 LA MUTAZIONE DI *KRAS*: ASPETTI CLINICI

Come detto in precedenza, l'analisi delle mutazioni di *KRAS* è di cruciale importanza, soprattutto per la sua valenza di fattore predittivo e, in misura minore, anche per il suo valore prognostico.

La valutazione della mutazione di *KRAS* in ampie casistiche di pazienti con mCRC ha portato a definirne specifiche caratteristiche cliniche, in particolare, numerosi sono stati gli studi che hanno mostrato la correlazione tra lo stato mutazionale di *KRAS* e la presenza di sedi metastatiche specifiche. In uno studio<sup>156</sup> numerosi campioni metastatici sono stati screenati per valutare la presenza della mutazione di *KRAS*; la prevalenza della mutazione di *KRAS* è stata poi confrontata nel:

- gruppo A (148 pazienti con mCRC da cui 161 metastasi di CRC): valutazione della prevalenza di *KRAS* tra le metastasi epatiche (N=65), polmonari (N=50) e cerebrali (N=46),

- gruppo B (604 pazienti di cui 49, 141, 270, 144 rispettivamente in stadio 1,2,3,4) in cui è stata valutata la prevalenza della mutazione di *KRAS* confrontandola nella coppia metastasi/tumore primitivo,

- gruppo C (859 pazienti in stadio 2 e 3 sottoposti a chirurgia con intento radicale e nessuno con evidenza di malattia metastasica al momento della resezione) in cui la prevalenza della mutazione di *KRAS* è stata confrontata tra le metastasi ed una coorte indipendente di tumori primitivi.

La prevalenza della mutazione di *KRAS* è risultata significativamente più alta nelle metastasi polmonari (62%) e cerebrali (56.5%) rispetto alle metastasi epatiche (32.3%;  $p=0.003$ ). Se confrontata con il primitivo la mutazione di *KRAS* è risultata essere più frequente nelle metastasi cerebrali e polmonari ( $p<0.005$ ) ma simile nelle metastasi epatiche. La mutazione di *KRAS* risulta quindi essere associata ad una ripresa polmonare (HR=2.1, 95%CI: 1.2-3.5,  $p=0.007$ ), ma non ad una ripresa epatica. Un ulteriore studio<sup>157</sup> a conferma della correlazione tra mutazione di *KRAS* e la sede di metastasi ha mostrato come le metastasi polmonari siano più frequenti nei pazienti *KRAS* mutati rispetto ai *KRAS* WT (45.3% vs 22.1%  $p=0.003$ ), mentre le metastasi epatiche (37.3% vs 70.6%  $p<0.001$ ) o linfonodali (6.7% vs 19.1%  $p=0.025$ ) sono inizialmente sedi metastatiche meno frequenti nei pazienti *KRAS* mutati rispetto ai *KRAS* WT.

Il ruolo di *KRAS* come biomarker prognostico di sopravvivenza nel mCRC, indipendentemente dalla terapia con anti-EGFR, è ad oggi poco chiaro. Lo studio RASCAL<sup>158</sup> per primo ha cercato di capire il significato prognostico delle mutazioni di *KRAS*, identificando un aumentato rischio di recidiva ( $p<0.001$ ) e di morte ( $p=0.004$ ) nei CRC *KRAS* mutati; nello specifico lo studio ha mostrato come la mutazione del codone 12, ma non del codone 13, rappresenti un fattore indipendente di aumentato rischio di recidiva ( $p=0.007$ ) e di morte ( $p=0.004$ ), correlandosi ad un comportamento più aggressivo di malattia. Lo studio RASCAL 2,<sup>159</sup> eseguito su un campione di pazienti più consistente ha confermato i dati del precedente trial. Importante sottolineare come i risultati riportati da entrambi gli studi sopracitati siano validi solo nei pazienti con CRC in stadio di Dukes C, aventi la mutazione p.G12V. Per meglio comprendere il ruolo prognostico di *KRAS* in relazione allo stadio del CRC e ad altre caratteristiche tumorali di possibile rilievo sull'outcome è stato condotto uno studio<sup>160</sup> su una popolazione di 1989 pazienti. I *KRAS* mutati (31%) hanno presentato una scarsa DFS (HR=1.37, 95%CI: 1.13-1.66) rispetto ai *KRAS* WT. Tuttavia questa correlazione non si è dimostrata evidente nella malattia metastatica, portando quindi alla conclusione che la mutazione di *KRAS* è

associata ad una sopravvivenza significativamente inferiore rispetto ai *KRAS* WT, ma solo nel setting di pazienti non metastatici.

La valenza predittiva di *KRAS* è sicuramente meno controversa del ruolo prognostico. La prima evidenza del ruolo predittivo di *KRAS* è emersa da uno studio francese<sup>161</sup>, che ha valutato la presenza di correlazione tra la risposta del paziente metastatico trattato con cetuximab in monoterapia e lo stato mutazionale del gene. Mutazioni di *KRAS* sono state riscontrate in 13 pazienti sul totale di 30 arruolati nello studio. Le mutazioni sono risultate strettamente associate alla risposta al trattamento, infatti, nessuno dei tumori mutati ha risposto al cetuximab. Tra i responders nessuno (0/11) ha presentato mutazioni di *KRAS*, mentre le stesse sono state riscontrate nel 68.4% (13/19) dei pazienti non responders ( $p=0.0003$ ). La sopravvivenza complessiva dei pazienti con tumore *KRAS* WT è risultata significativamente più alta se confrontata con quella di pazienti *KRAS* mutati (OS mediana: 16.3 vs 6.9mesi;  $p=0.016$ ). Risultati analoghi sono emersi anche dall'analisi retrospettiva dei pazienti trattati nell'ambito dello studio CO.17<sup>162</sup>. In questo trial sono stati analizzati i campioni tumorali, ottenuti da 394 dei 572 pazienti (68,9%) con mCRC, randomizzati a ricevere terapia di supporto più o meno cetuximab.. Il 42,3% aveva una mutazione nell'esone 2 del gene di *KRAS*. Nei pazienti con tumore wild type, il trattamento con cetuximab rispetto alla sola terapia di supporto ha migliorato significativamente l'OS (9.5 vs 4.8 mesi,  $HR=0,55$ ;  $p<0,001$ ) e la PFS (3.7 mesi vs 1.9 mesi,  $HR=0,40$ ,  $p<0,001$ ). Tra i pazienti mutati, non vi è stata alcuna differenza significativa tra coloro trattati con cetuximab e quelli con sola terapia di supporto in termini di OS ( $HR=0.98$ ;  $p=0.89$ ) o PFS ( $HR=0.99$ ,  $p=0.96$ ). Nel gruppo dei pazienti trattati con sola BSC, lo stato mutazionale *KRAS* non è risultato significativamente associato con la sopravvivenza generale ( $HR=1.01$ ,  $p=0.97$ ).

Anche per quanto riguarda panitumumab, studi retrospettivi hanno confermato il ruolo predittivo delle mutazioni di *KRAS*: lo studio<sup>163</sup> che ha valutato panitumumab vs terapia di supporto in pazienti con mCRC chemiorefrattario, ha dimostrato che il relativo vantaggio determinato dalla somministrazione di panitumumab è ristretto ai pazienti *KRAS* WT ( $HR=0.45$ ; 95%CI 0.34-0.59; PFS mediana: 12.3 settimane per panitumumab vs 7.3 settimane per la terapia di supporto) mentre non si rileva alcun effetto nei pazienti *KRAS* mutati ( $HR=0.99$ ; 95%CI 0.73-1.36; PFS mediana: 7.4 settimane per panitumumab vs 7.3 settimane per BSC).

Nell'ambito del trattamento di prima linea del mCRC, lo studio CRYSTAL<sup>136</sup>, ha valutato l'efficacia della combinazione FOLFIRI+cetuximab vs solo FOLFIRI. La mutazione di *KRAS* a livello dei codoni 12 e 13 è stata identificata in 397 campioni

tumorali di 1063 pazienti arruolati (37%). In termini di PFS (obiettivo primario dello studio), una differenza statisticamente significativa in favore di cetuximab è stata evidenziata solo tra i pazienti *KRAS* WT (PFS mediana: 9.9 mesi (cetuximab+FOLFIRI) vs 8.4 mesi (solo FOLFIRI); HR=0.69, p=0.0012;). Anche in termini di RR (obiettivo secondario) la differenza è risultata statisticamente significativa solo tra i pazienti WT (RR: 57.3% (FOLFIRI+cetuximab) vs 39.7% (FOLFIRI); p=0.001). Il trial OPUS<sup>137</sup> ha presentato risultati del tutto analoghi. Dei pazienti con tumore metastatico randomizzati a ricevere in prima linea FOLFOX o FOLFOX+cetuximab, solo quelli *KRAS* WT hanno ottenuto un beneficio dall'associazione del biologico alla terapia convenzionale (PFS mediana nei *KRAS* WT: 8.3 mesi FOLFOX+cetuximab vs 7.2 mesi solo FOLFOX; HR=0.567, p=0.0064). Inoltre il trattamento con cetuximab ha determinato un netto peggioramento della PFS nei pazienti *KRAS* mutati (PFS mediana: 5.5 mesi (FOLFOX+cetuximab) vs 8.6 mesi (solo FOLFOX), HR=1.720, p=0.0153), suggerendo un possibile effetto detrimentalmente in questo gruppo.

In relazione a bevacizumab, la mutazione di *KRAS* non ha mostrato alcuna significativa correlazione con l'outcome clinico, come dimostra lo studio retrospettivo di Hurwitz e coll; in questo trial,<sup>164</sup> finalizzato a valutare il ruolo delle mutazioni di *KRAS* nel trattamento con bevacizumab, è emerso che il vantaggio in PFS ottenuto con l'anticorpo è indipendente dallo stato mutazionale di *KRAS*. Anche lo studio di Ince e coll (*vedi paragrafo successivo*) ha ulteriormente confermato che i pazienti *KRAS* mutati in trattamento con bevacizumab ottengono un vantaggio in PFS statisticamente significativo rispetto ai pazienti trattati con sola chemioterapia, confermando che le mutazioni di *KRAS* non influenzano l'attività di bevacizumab.

### 3.3 LA MUTAZIONE DI BRAF: ASPETTI CLINICI

Numerosi studi hanno dimostrato che i tumori *BRAF* mutati presentano caratteristiche clinico-patologiche e demografiche specifiche. Nello studio di Tie et al.<sup>165</sup> lo stato mutazionale di *BRAF* e *KRAS* e l'instabilità microsatellitare sono state correlate con le caratteristiche cliniche e l'outcome dei pazienti. Questo studio ha valutato la mutazione di *BRAF* e *KRAS* nel primitivo di 525 pazienti con CRC e in 81 coppie primitivo/metastasi. I risultati mostrano come l'età avanzata (>70 anni, p=0.04), il sesso femminile (p=0.0005) e la localizzazione destra del tumore (p<0.0001) siano elementi clinici associati alla presenza della mutazione *BRAF* V600E.

Interessante è la correlazione tra la mutazione di *BRAF* e l'istotipo tumorale mucinoso, individuata in uno studio condotto da Ogino e coll<sup>166</sup> in cui sono state valutate le mutazioni di *BRAF* e *KRAS* in 167 CRC mucinosi e 457 non mucinosi. Lo studio ha dimostrato come i tumori mucinosi presentino una frequenza di mutazioni *BRAF* superiore rispetto ai tumori non-mucinosi (15-27% vs. 8.6%,  $p < 0.001$ ), riportando quindi una correlazione significativa tra i due aspetti.

In questi ultimi anni gli studi effettuati sulla mutazione di *BRAF* hanno fatto emergere come essa rappresenti un potente fattore prognostico. Questa condizione è stata dimostrata in uno studio<sup>167</sup> che ha messo in evidenza come i pazienti *BRAF* mutati abbiano una maggiore probabilità di progressione di malattia ( $p < 0.0001$ ) e morte ( $p < 0.0001$ ) rispetto ai *BRAF* WT, indipendentemente dallo regime di trattamento adottato. La mutazione di *BRAF* è inoltre predittiva di recidiva precoce (HR=4.0, 95%CI 2.2-7.4) e morte (HR=4.0, 95%CI 2.1-8.0). Un'ulteriore conferma del forte ruolo prognostico di *BRAF*, proviene dallo studio di Yokota<sup>168</sup> che ha valutato la mutazione *BRAF* e *KRAS* in 299 pazienti con mCRC trattati con chemioterapia. I risultati mostrano che la sopravvivenza mediana per i pazienti con mutazione *BRAF* e *KRAS* è rispettivamente di 11.0 e 27.7 mesi, significativamente peggiore rispetto ai pazienti WT, aventi una sopravvivenza mediana di 40.6 mesi (*BRAF*; HR=4.25,  $p < 0.001$ , *KRAS* 13; HR=2.03,  $p = 0.024$ ).

Di Nicolantonio et al.<sup>169</sup> hanno per primi proposto un ruolo potenziale della mutazione di *BRAF* nel predire la resistenza ad agenti anti-EGFR. Nello studio sono state analizzate retrospettivamente RR, TTP (time to progression), OS e stato mutazionale di *KRAS* e *BRAF* in 113 pazienti con mCRC trattati con cetuximab o panitumumab. Nessuno dei pazienti *BRAF* mutati (11 su 79 *KRAS* WT) ha risposto al trattamento, mentre nessuno dei responders ha presentato la mutazione di *BRAF* ( $p = 0.029$ ). Inoltre i pazienti *BRAF* mutati, rispetto ai WT hanno ottenuto una PFS ( $p = 0.011$ ) ed un OS ( $p < 0.0001$ ) significativamente più brevi. Un'ulteriore studio a conferma del ruolo prognostico di *BRAF* è il sopracitato trial di Souglakos<sup>168</sup> in cui nessuno dei 9 pazienti aventi la mutazione di *BRAF* V600E ha risposto a cetuximab, mostrando una PFS significativamente peggiore dei *BRAF* WT (2 vs 3.9 mesi, HR=3.6, 95%CI 1.8-7.4). Dati più recenti, sono stati estrapolati da una analisi retrospettiva di una ampia coorte di pazienti metastatici svolta da de Roock et al.<sup>170</sup>. Nello studio sono stati analizzati 1022 campioni di DNA tumorale, provenienti da pazienti trattati con cetuximab; 773 campioni hanno presentato una quota di DNA sufficiente per l'inclusione nell'analisi di frequenza

di mutazione di *KRAS*, *BRAF*, *NRAS* e *PIK3CA*. In un sottogruppo di 649 pazienti chemiorefrattari trattati con cetuximab e chemioterapia sono state analizzate l'OR (objective response), PFS e OS. Il 40% dei tumori analizzati ha presentato una mutazione di *KRAS*, il 4.7% una mutazione di *BRAF*. Lo studio ha confermato che i pazienti *KRAS* mutati non mostrano un beneficio dall'aggiunta di cetuximab se confrontati con i WT (RR 6.7% vs 35.8%; OR=0.13, 95%CI 0.07-0.22; p<0.0001). Inoltre i *KRAS* WT, ma con mutazione di *BRAF* o *NRAS* hanno presentato una RR significativamente inferiore dei *BRAF* e *NRAS* WT ( RR 8.3% dei BRAF mutati vs 38.% dei BRAF WT; OR 0.15, 95%CI 0.02-0.51; p=0.0012). Lo studio mostra quindi che, sia in pazienti non selezionati, sia nei *KRAS* WT, la presenza della mutazione *BRAF* identifica pazienti che traggono scarso beneficio clinico dalla strategia anti-EGFR. Questi dati sono stati ulteriormente supportati da una metanalisi<sup>171</sup> tratta da 11 studi retrospettivi includenti un totale di 546 pazienti con mCRC trattati, in linee avanzate, con anti-EGFR. Nel gruppo dei pazienti *KRAS* WT (376), lo studio ha riportato un ORR (objective response rate) nei *BRAF* mutati dello 0%, nei *BRAF* WT del 36.3%. La metanalisi mostra come la mutazione di *BRAF* determini una assenza di risposta agli agenti anti-EGFR nella popolazione *KRAS* WT. (RR (risk ratio) totale=0.14, 95%CI 0.04-0.53, p=0.004).

Fondamentale è sottolineare che, in prima linea di trattamento, nei pazienti *BRAF* mutati, il vantaggio ottenuto con l'uso degli anti-EGFR, seppur statisticamente significativo, è clinicamente poco rilevante. Questa considerazione conduce molti clinici alla scelta di non utilizzare il trattamento con anti-EGFR in questo gruppo di pazienti.

Come visto in precedenza per le mutazioni di *KRAS*, l'efficacia di bevacizumab è indipendente dalla mutazione di *BRAF*. A dimostrazione di quanto affermato, lo stato mutazionale di *BRAF* è stato valutato retrospettivamente in 295 pazienti inclusi nel trial AVF2107<sup>172</sup>, mostrando proprio come l'efficacia del farmaco biologico sia indipendente dalla mutazione di *BRAF*. Inoltre, indipendentemente dal tipo di trattamento ricevuto, i pazienti *BRAF/KRAS* WT hanno mostrato una prognosi migliore rispetto ai pazienti con tumori *BRAF/KRAS* mutati, (HR=0.51, 95%CI 0.28-0.95 nei pazienti trattati con bevacizumab; HR=0.66, 95%CI 0.37-1.18 nei pazienti trattati con placebo). Al test di interazione è stato dimostrato che il vantaggio ottenuto con bevacizumab è indipendente dallo stato mutazionale. (HR=0.59, 95%CI 0.39-0.89, p=0.01).

## Capitolo 4. Il ruolo delle mutazioni di *KRAS* e *BRAF* nella prognosi dei pazienti affetti da carcinoma coloretale con metastasi epatiche resecate

### 4.1 INTRODUZIONE E RAZIONALE

Per i pazienti affetti da mCRC e interessamento epatico la resezione chirurgica delle metastasi può rappresentare una concreta possibilità di cura<sup>108</sup>. Attualmente i fattori che permettono di selezionare un paziente per un intervento di resezione epatica sono esclusivamente clinici. Tra i parametri valutati i criteri di Fong<sup>111</sup> rivestono un ruolo rilevante ma, ancora più centrale è la valenza della discussione multidisciplinare che nel confronto tra oncologi, chirurghi e radiologi permette una valutazione integrata degli aspetti tecnici e oncologici della malattia.

Recentemente, nell'inquadramento globale di un paziente con mCRC, è emerso il ruolo fondamentale delle mutazioni di *KRAS* e *BRAF*, di cui ben noto è il valore predittivo e prognostico, ma di cui poco si conosce in relazione all'impatto nel setting dei pazienti candidati a resezione delle metastasi epatiche. A tale proposito, un recente studio condotto da Teng e coll.<sup>173</sup> ha valutato il ruolo delle mutazioni di *KRAS* e *BRAF* nei pazienti sottoposti a metastasectomia epatica. Sono stati studiati retrospettivamente 292 pazienti sottoposti a metastasectomia epatica con intento curativo. L'analisi mutazionale è stata eseguita sulle metastasi epatiche resecate. La mutazione di *KRAS* è stata riscontrata in 111 pazienti (38%). La mutazione di *BRAF* è stata rilevata in 6 pazienti (2.1%). Come atteso le mutazioni di *KRAS* e *BRAF* sono risultate sempre mutualmente esclusive. L'analisi delle caratteristiche della popolazione esaminata non ha mostrato differenze significative nel gruppo *KRAS/BRAF* mutati rispetto ai WT, ad eccezione della localizzazione del tumore primitivo. Il tasso di sopravvivenza della popolazione generale a 5 anni è stato del 55.5%; nei pazienti con mutazioni di *KRAS* e *BRAF* è stato di 38.0 e 2.1%, rispettivamente. L'OS mediana dei pazienti con la mutazione di *BRAF* è stata di soli 8.2 mesi, significativamente peggiore rispetto ai pazienti *KRAS/BRAF* WT (19.7 mesi) e *KRAS* mutati (19.6 mesi) ( $p=0.006$ ). Per quanto riguarda gli altri fattori prognostici già noti, all'analisi univariata, tumori sincroni, più di 3 metastasi epatiche, margini di resezione positivi, malattia extraepatica concomitante si sono confermati essere associati a scarsa sopravvivenza. All'analisi multivariata la mutazione di *BRAF* si è confermata come fattore prognostico indipendente ( $HR=5.181$ ,  $p=0.002$ ). Tuttavia da

questo trial non risulta possibile trarre considerazioni definitive, dato l'esiguo numero di pazienti *BRAF* mutati presenti nello studio (6/292) e sulla base della natura retrospettiva del trial stesso; inoltre resta da chiarire il ruolo della mutazione di *BRAF* come fattore prognostico in termini di RFS.

Un ulteriore studio<sup>174</sup> è andato a definire il ruolo delle mutazioni di *KRAS* e *BRAF* in una coorte di 126 pazienti sottoposti a resezione epatica con intento radicale. L'analisi mutazionale è stata eseguita sulle metastasi epatiche di 100 dei 126 pazienti arruolati. Il 27% dei pazienti è risultato mutato sui codoni 12 o 13 di *KRAS*, il 3% su *BRAF* e il 70% dei pazienti è risultato *KRAS/BRAF* WT. In termini di DFS il confronto tra *KRAS/BRAF* wt, *KRAS* mutati e *BRAF* mutati ha evidenziato come la prognosi sia influenzata dallo stato mutazionale di *BRAF* ma non da quello di *KRAS* (*BRAF* mutati versus *KRAS/BRAF* WT  $p < 0.005$ ; *KRAS* mutati versus *KRAS/BRAF* WT  $p = 0.61$ ). In termini di OS la mutazione di *BRAF* ha confermato il suo ruolo prognostico ( $p < 0.001$ ) ed è emersa anche una differenza statisticamente significativa tra *KRAS* mutati e *KRAS/BRAF* WT ( $p = 0.034$ ). All'analisi multivariata il numero di metastasi epatiche maggiore di 5 (HR=6.42,  $p = 0.029$ ), la presenza di malattia extraepatica (HR=4.69,  $p = 0.012$ ) e la presenza di mutazioni di *KRAS/BRAF* (HR=2.36,  $p = 0.045$ ) sono risultate significativamente correlate all'OS. I *BRAF* mutati identificati nel campione in studio (3/100) sono, anche in questo trial, troppo esigui per poter trarre delle conclusioni definitive. Tuttavia entrambi gli studi, seppur retrospettivi, fanno emergere come l'incidenza della mutazione di *BRAF* nei pazienti candidati a resezione epatica con intento radicale, sia meno frequente (2-3%) rispetto a quella che si rileva nella popolazione generale di pazienti con mCRC (10%). Uno studio, presentato all'ultimo congresso ASCO, ha ulteriormente analizzato il ruolo della mutazione di *KRAS* sull'outcome di 169 pazienti sottoposti a resezione radicale di metastasi epatiche<sup>175</sup> con intento radicale, trattati in seguito con chemioterapia adiuvante sistemica o intraepatica. L'incidenza della mutazione di *KRAS* è stata del 30%. La RFS a 3 anni è stata del 48% nei *KRAS* WT e del 30% nei mutati ( $p < 0.01$ ), l'OS a 3 anni è stata del 96% nei *KRAS* WT e dell'80% nei mutati ( $p = 0.08$ ). Seppur considerando l'esiguo numero di pazienti valutati e la natura retrospettiva dell'analisi tali evidenze sottolineano il ruolo prognostico della mutazione di *KRAS* in questo setting. Inoltre in questo studio è emerso come i pazienti *KRAS* mutati siano più a rischio di sviluppare metastasi ossee ( $p < 0.01$ ), cerebrali ( $p = 0.05$ ) e polmonari ( $p < 0.01$ ) rispetto ai *KRAS* WT. Infine un altro studio condotto da un gruppo austriaco ha valutato l'impatto della mutazione di *KRAS*<sup>176</sup> in pazienti sottoposti a resezione epatica dopo un trattamento pre-operatorio con bevacizumab. Lo studio ha arruolato 60 pazienti, di cui 25 con mutazione di *KRAS*. La



risposta radiologica alla chemioterapia neoadiuvante, in accordo con i criteri RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumours), è stata parziale in 52 pazienti (87%) e nei rimanenti 8 la malattia si è presentata stabile. La percentuale di pazienti che ha presentato una risposta parziale è stata simile tra i pazienti *KRAS* mutati ed i *KRAS* WT ( $p=0.400$ ). La mutazione di *KRAS* è risultata però correlata ad un effetto prognostico negativo sulla RFS (HR=2.48, 95%CI 1.26-4.89,  $p=0.009$ ) e sull'OS (HR=3.51, 95%CI 1.30-9.45,  $p=0.013$ ). Lo studio ha quindi fornito ulteriori evidenze sul ruolo prognostico di *KRAS* in termini di RFS e OS, mostrando inoltre come la chemioterapia neoadiuvante comprendente bevacizumab induca una risposta, indipendentemente dallo status di *KRAS*, in questo gruppo di pazienti con CLM. In conclusione, per quanto riguarda il ruolo prognostico della mutazione di *BRAF* sono necessari ulteriori studi di conferma, mentre per la mutazione di *KRAS* i dati discordanti emersi dagli studi sopracitati necessitano di chiarezza.

## 4.2 DISEGNO, MATERIALI E METODOLOGIA

### ***Disegno dello studio***

Partendo da queste considerazioni, i dati clinici di pazienti affetti da mCRC sono stati valutati retrospettivamente in 3 centri oncologici italiani (Pisa, Padova, Udine). Per l'inclusione nella presente analisi sono stati selezionati i pazienti andati incontro a resezione epatica con intento radicale.

Le informazioni cliniche sono state raccolte su un database elettronico predefinito e analizzate al termine della raccolta dei dati.

### ***Obiettivi dello studio***

Obiettivo dello studio è valutare l'incidenza e l'impatto prognostico delle mutazioni di *BRAF* e *KRAS* nei pazienti affetti da mCRC sottoposti a resezione epatica con intento radicale.

Endpoint primario dello studio è il confronto della RFS tra pazienti con mutazione di *BRAF* e pazienti WT.

Endpoint secondari sono il confronto in termini di RFS in relazione allo stato mutazionale di *KRAS* e in termini di OS e tasso di resezioni radicali (R0 vs R1-R2) in relazione allo stato mutazionale sia di *BRAF* che di *KRAS*.

### ***Selezione dei pazienti***

Sono stati ritenuti eleggibili per lo studio e inclusi nell'analisi pazienti con le seguenti caratteristiche:

- Diagnosi di adenocarcinoma del colon-retto confermata istologicamente
- Disponibilità del blocchetto tumorale in paraffina del tumore primitivo o delle metastasi o stato mutazionale di *KRAS* e *BRAF*, del primitivo o delle metastasi, già valutato in precedenza.
- Resezione con intento curativo delle metastasi epatiche
- Disponibilità dei dati clinici e adeguata rivalutazione di malattia post resezione epatica eseguita ogni 2-4 mesi dopo l'intervento comprendente la registrazione dei marcatori tumorali e gli esami di imaging.

### ***Analisi mutazionale di KRAS e BRAF***

Le analisi dello stato mutazionale di *KRAS* e *BRAF* sono state effettuate presso i dipartimenti di Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, dell'Istituto Oncologico Veneto e dell'Ospedale di Udine. La valutazione è stata effettuata su campioni del tumore primitivo e/o delle metastasi epatiche resecate. Nei campioni tumorali disponibili è stata ricercata la presenza di mutazioni attivanti dei codoni 12, 13 (esone 2) e 61 (esone 3) di *KRAS* e del codone 600 (esone 15) di *BRAF*. Il DNA è stato estratto dai campioni tumorali utilizzando il Qiamp DNA tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Il DNA è stato amplificato per *KRAS* e *BRAF* usando i kits Anti-EGFR MoAb response® (DIATECH Pharmacogenetics) tramite PCR eseguita con Rotor-Gene™ 6000. Il pirosequenziamento è stato svolto usando i reagenti PyroMark Gold Q96 (QIAGEN Hilden Germany) e i risultati sono stati analizzati con il software PyroMark Q24 1.0.9.

### ***Considerazioni statistiche***

La correlazione tra le caratteristiche cliniche e patologiche e la mutazione di *BRAF* e *KRAS* è stata valutata con il  $\chi^2$  test o il test di Fisher.

La RFS è stata definita come il tempo intercorso tra la resezione epatica e la ripresa di malattia.

L'OS è stata definita come il tempo intercorso tra la data della resezione epatica e il decesso del paziente avvenuto per qualsiasi causa.

La distribuzione delle sopravvivenze è stata stimata utilizzando il metodo delle curve di Kaplan-Meier ed il modello proporzionale di Cox è stato applicato per le analisi univariate e multivariate.

### 4.3 RISULTATI

#### ***Caratteristiche dei pazienti***

Sono stati screenati 3024 pazienti con CRC afferenti ai centri di Pisa, Padova e Udine dal Gennaio 1995 al Dicembre 2012. Nel presente studio sono stati inclusi 360 pazienti sottoposti a resezione epatica, le cui analisi mutazionali sono state eseguite presso i centri di Pisa, Padova e Udine. Le principali caratteristiche cliniche della popolazione sono descritte nella tabella 1. L'età mediana della popolazione inclusa nello studio è di 62 anni (range: 25-85). La maggior parte dei pazienti (86%) ha presentato un PS 0 al momento della diagnosi, il 13% dei pazienti un PS1 e l'1% un PS2.

Al momento dell'analisi, 258 pazienti hanno presentato recidiva di malattia dopo resezione epatica. In 196 casi (76%) la recidiva ha interessato un singolo organo, in particolare i distretti interessati sono stati: il fegato in 127 pazienti (50%), polmone in 38 pazienti (15%), linfonodi in 12 pazienti (5%), peritoneo in 5 pazienti (1%), 4 pazienti (1%) hanno presentato una recidiva locale, 10 pazienti (4%) hanno presentato sedi di recidiva diverse da quelle sopra indicate. Sessantadue pazienti (24%) hanno presentato multiple sedi di recidiva.

Per quanto riguarda i trattamenti ricevuti, 183 pazienti sono stati trattati pre-operatoriamente: di questi 40 con chemioterapia esclusiva (a base di 2 o 3 farmaci citotossici), 116 con chemioterapia e bevacizumab e 18 con chemioterapia e un anti-EGFR; 9 pazienti hanno ricevuto un trattamento diverso da quelli sopra elencati. Dei 177 pazienti non trattati pre-operatoriamente 128 hanno ricevuto un trattamento post-operatorio, 110 con sola chemioterapia, 11 con chemioterapia e un farmaco biologico e 7 hanno ricevuto altri trattamenti (vedi tabella 5).

In relazione allo score di Fong i dati sono presentati nella tabella 2. In 246 su 360 pazienti è stato possibile valutare tutti i 5 parametri; sono risultati a basso (tra 0 e 2 punti) e alto rischio (tra 3 e 5 punti) 123 pazienti per gruppo rispettivamente.

#### ***Analisi dello stato mutazionale di KRAS e BRAF***

La valutazione dello stato mutazionale di *KRAS* è risultata informativa in 358 dei 360 pazienti inclusi nella popolazione in studio. Il 63% (N=224) dei casi è risultato *KRAS* WT, il 32% (N=116) mutato e in 18 casi (7.7% dei casi di cui era disponibile la coppia primitivo-metastasi) si è avuto un esito discordante.

La valutazione dello stato mutazionale di *BRAF* è stata possibile su 360 campioni; il 97% dei casi (N=349) è risultato WT, il 3% (N=11) è risultato *BRAF* V600E mutato. In nessun

campione tumorale sono state riscontrate entrambe le mutazioni. I dati nel dettaglio sono presentati nella tabella 3.

Come riportato in tabella 4 il confronto delle caratteristiche di malattia tra i pazienti *KRAS* e *BRAF* WT (all WT), *KRAS* mutati e *BRAF* mutati non ha mostrato differenze statisticamente significative, ad eccezione della localizzazione del tumore primitivo: nei pazienti *BRAF* mutati si è infatti osservata una correlazione tra la mutazione e l'insorgenza di tumore primitivo a destra, presente in 7 (64%) su 11 pazienti *BRAF* mutati ( $p<0.0001$ ); nei pazienti *KRAS* mutati invece la sede del primitivo si è presentata più frequentemente a sinistra (63%,  $p<0.0001$ ).

### ***Analisi di outcome***

I dati sono riportati nella tabella 6. La RFS mediana, endpoint primario dello studio, è stata di 12.6, 11.0 e 5.7 mesi, rispettivamente nei pazienti all WT, *KRAS* mutati e *BRAF* mutati ( $p=0.01$ ) (figura 2). Il confronto della RFS tra pazienti *BRAF* mutati e *BRAF* WT è risultato significativo (HR=4.25, 95%CI 1.52-11.88,  $p=0.005$ ), come mostrato in figura 1. All'analisi univariata caratteristiche quali PS 1-2 (HR=1.60, 95%CI 1.09-2.36,  $p=0.02$ ), presenza di malattia extraepatica (HR=2.22, 95%CI 1.31-3.75,  $p=0.003$ ), metastasi epatiche bilobarri (HR=1.60, 95%CI 1.23-2.10,  $p=0.0006$ ) o sincrone (HR=1.33, 95%CI 1.03-1.71  $p=0.03$ ) o multiple (HR=1.68, 95%CI 1.31-2.15,  $p<0.0001$ ), margini di resezione positivi (HR=2.61, 95%CI 1.76-3.87,  $p<0.0001$ ), diagnosi di tumore primitivo con linfonodi interessati (HR=1.54, 95%CI 1.19-2.0,  $p=0.001$ ) si sono presentate correlate a scarsa RFS.

L'OS mediana dei pazienti con mutazione di *BRAF* è stata di 21 mesi, significativamente peggiore rispetto ai pazienti all WT e *KRAS* mutati (rispettivamente con OS di 60.7 mesi e 40.7 mesi,  $p=0.0013$ ). All'analisi univariata caratteristiche quali PS>0 (HR=2.74, 95%CI 1.65-4.65,  $p<0.0001$ ), la localizzazione destra del tumore primitivo, la presenza di malattia extraepatica (HR=2.93, 95%CI 1.43-6.0,  $p=0.003$ ), metastasi epatiche bilobarri (HR=1.91, 95%CI 1.34-2.72,  $p=0.0003$ ) o multiple (HR=1.88, 95%CI 1.35-2.62,  $p=0.0002$ ), margini di resezione positivi (HR=4.74, 95%CI 2.83-7.94,  $p<0.0001$ ), primitivo con linfonodi positivi (HR=2.37, 95%CI 1.83-3.05,  $p<0.0001$ ) si sono associate a scarsa sopravvivenza.

### ***Analisi multivariata***

All'analisi multivariata si è confermato il valore prognostico della mutazione di *BRAF* (HR=1.53, 95%CI 1.10-2.14, p=0.01), dei margini di resezione positivi (HR=2.65, 95%CI 1.79-3.93, p<0.0001) e dell'high risk score di Fong (HR=1.62, 95%CI 1.10-2.37, p=0.01) in termini di RFS (vedi tabella 7).

In termini di OS si sono mantenute significative la mutazione di *BRAF* (HR=1.57, 95%CI 1.05-2.35, p=0.03), il PS>0 (HR=1.70, 95%CI 1.03-2.79, p=0.04), i margini di resezione positivi (HR=3.88, 95%CI=2.38-6.34, p=0.0001), l'high risk score di Fong (HR=2.20, 95%CI 1.38-3.51, p=0.0010) ( vedi tabella 8).

#### 4.4 DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

Dati questi risultati, il nostro studio si configura come il lavoro più ampio e dettagliato fino ad oggi eseguito, sull'impatto delle mutazioni di *KRAS* e *BRAF* in termini di RFS e OS in pazienti sottoposti a resezione di metastasi epatiche da CRC. Nella nostra analisi si conferma come nei pazienti potenzialmente candidati ad una chirurgia resettiva epatica la frequenza della mutazione di *BRAF* (3%) sia decisamente inferiore rispetto a quella comunemente riscontrata nei pazienti con mCRC in generale (8-10%). Questo riscontro può essere spiegato dal fatto che pazienti con mCRC e mutazione di *BRAF*, in virtù delle considerazioni fatte in precedenza, hanno scarse probabilità di presentare malattia esclusivamente epatica e di raggiungere in un qualunque momento della loro storia clinica una condizione favorevole per considerare una chirurgia resettiva epatica.

Nella nostra casistica la mutazione di *BRAF* è associata ad un outcome significativamente peggiore sia in termini di RFS che OS, sia in uni che multivariata, individuando pazienti senza chance di RFS o di OS a lungo termine.

Come già dimostrato dal sopraccitato studio di Umeda e coll.<sup>174</sup>, la presenza della mutazione di *KRAS* non ha mostrato una valenza prognostica in termini di RFS, pur risultando correlata significativamente con l'OS. Questo dato può trovare una spiegazione almeno parziale, nel fatto che molti pazienti abbiano ricevuto farmaci anti-EGFR nelle fasi avanzate di malattia (i.e. dopo la ricaduta) e che, in virtù del ruolo predittivo negativo della mutazione di *KRAS*, i pazienti wt abbiano derivato un vantaggio da tali trattamenti.

In relazione alla RFS mediana, questa è stata di 12.6, 11.0 e 5.7 mesi rispettivamente nei pazienti all WT, *KRAS* mutati e *BRAF* mutati, risultando significativamente inferiore nei pazienti *BRAF* mutati rispetto agli altri gruppi (p=0.01).

In termini di sopravvivenza globale il gruppo dei pazienti *KRAS* mutati ha ottenuto una OS mediana 40.7 mesi, i pazienti *BRAF* mutati di 21.0 mesi, i pazienti all WT di 60.7 mesi (p=0.0013).

All'analisi multivariata viene mantenuto il ruolo prognostico della mutazione di *BRAF* sia in termini di RFS che di OS.

Se da una parte è vero che i risultati ottenuti si applicano ad un gruppo di pazienti piuttosto ristretto dal punto di vista numerico è altresì particolarmente rilevante il significato clinico che possono rivestire. L'analisi mutazionale di *BRAF* è un test particolarmente semplice dal punto di vista tecnico e ad oggi routinariamente disponibile per gran parte degli oncologi medici. Nella condizione di dover valutare l'indicazione ad

un intervento di chirurgia maggiore, teoricamente gravato da un rischio non trascurabile di morbidità e mortalità post-operatoria, da alti costi e certamente di grande impegno clinico per i pazienti e per le strutture sanitarie, la disponibilità di un test che possa consentire a priori una previsione univoca e rilevante sulle possibilità di sopravvivenza a medio-lungo termine può essere strategica. Il riscontro della mutazione di *BRAF* indica con ragionevole certezza che vi sono scarsissime possibilità di sopravvivenza libera da ricaduta dopo resezione epatica con intento curativo. Nel nostro studio, pur straordinariamente ampio (la casistica selezionata di 360 pazienti è ottenuta dalla revisione iniziale di 3024 casi), il numero esiguo (n=11) di pazienti *BRAF* mutati identificati non permette di dare una chiara risposta sulle ragioni clinico-biologiche dei risultati ottenuti. Una delle ipotesi fondanti di questa analisi era che i pazienti con mutazioni di *BRAF* potessero più frequentemente recidivare in tempi brevi in sedi extraepatiche, ma questo non appare così evidente. Rimane il fatto che questi pazienti presentano comunque, recidivando in tempi particolarmente brevi, una malattia micrometastatica occulta non visibile agli esami comunemente condotti in fase di ristadiatione pre-operatoria né in sede di intervento. Questa considerazione apre la prospettiva clinica di considerare, in casi di pazienti *BRAF* mutati potenzialmente candidabili a chirurgia resettiva epatica, un work-up pre-operatorio particolarmente intensivo, ad esempio con RM con mezzo di contrasto epato-specifico e ecografie con mezzo di contrasto. Questi esami hanno recentemente dimostrato di poter avere in condizioni specifiche una sensibilità maggiore della TC che routinariamente si esegue in questi casi. Allo stesso tempo, da un punto di vista oncologico medico, potrebbe essere consigliato di considerare con estrema cautela resezioni epatiche aggressive e in tempi troppo ristretti in questi pazienti, riservando questa opportunità solo a condizioni estremamente selezionate in cui non vi sia nessun altro fattore di rischio specifico e una storia clinica di risposta ai trattamenti di lunga durata.

In linea generale questi risultati portano senza dubbio un utile avanzamento nella conoscenza del mCRC e rafforzano l'importanza dell'approccio biomolecolare allo studio di questa malattia progressivamente più trattabile ma allo stesso tempo sempre più complessa.





#### 4.5 TABELLE E FIGURE

**Tabella 1. Caratteristiche della popolazione inclusa nell'analisi**

<b>Caratteristiche dei pazienti</b>	<b>N=360</b>	<b>%</b>
<b>Sesso</b>		
<i>Maschi</i>	226	63%
<i>Femmine</i>	134	37%
<b>Età</b>		
<i>Mediana</i>	62	
<i>Range</i>	25-85	
<b>Performance Status</b>		
<i>0</i>	310	86%
<i>1</i>	46	13%
<i>2</i>	4	1%
<b>Sede del tumore primitivo</b>		
<i>Colon destro</i>	98	27%
<i>Colon sinistro</i>	168	47%
<i>Retto extraperitoneale</i>	92	25.5%
<i>Primitivi sincroni &gt;1</i>	2	0.5%
<b>Presenza di malattia extraepatica</b>		
<i>Si</i>	330	92%
<i>No</i>	30	8%
<b>Localizzazione delle metastasi epatiche</b>		
<i>Unilobari</i>	227	63%
<i>Bilobari</i>	133	37%
<b>Presentazione delle metastasi</b>		
<i>Metacrona</i>	115	32%
<i>Sincrona</i>	245	68%
<b>Tempo tra diagnosi delle metastasi e resezione</b>		
<i>0 mesi</i>	75	21%
<i>≤6 mesi</i>	90	25%
<i>&gt;6 mesi</i>	195	54%
<b>Esito dell'intervento resettivo epatico</b>		
<i>R0</i>	300	83%
<i>R1</i>	31	9%
<i>R2</i>	23	6%
<i>Laparotomia esplorativa</i>	6	2%

**Tabella 2. Fattori prognostici nella popolazione generale: lo score di Fong**

<b>Caratteristiche dei pazienti</b>	<b>N=360</b>	<b>%</b>
<b>Primitivo con linfonodi positivi</b>		
<i>Si</i>	245	68%
<i>No</i>	107	30%
<i>NV</i>	8	2%
<b>Intervallo libero da malattia &lt;12 mesi</b>		
<i>Si</i>	282	79%
<i>No</i>	78	21%
<b>Numero di metastasi epatiche &gt;1</b>		
<i>Si</i>	200	55%
<i>No</i>	154	43%
<i>NV</i>	6	2%
<b>Diametro delle metastasi epatiche &gt;5cm</b>		
<i>Si</i>	73	20%
<i>No</i>	267	74%
<i>NV</i>	20	6%
<b>CE0A&gt;200 ng/mL</b>		
<i>Si</i>	11	3%
<i>No</i>	246	68%
<i>NV</i>	103	29%
<b>Score di Fong valutabile (5 parametri)</b>	246	
<i>0</i>	12	5%
<i>1</i>	46	19%
<i>2</i>	65	26%
<i>3</i>	89	36%
<i>4</i>	30	12%
<i>5</i>	4	2%

**Tabella 3. Analisi dello stato mutazionale di KRAS e BRAF**

<b>Stato mutazionale</b>	<b>Totale N=360</b>	<b>%</b>	<b>Prim</b>	<b>%</b>	<b>Mets</b>	<b>%</b>	<b>Coppie</b>	<b>%</b>
<b>KRAS</b>								
<i>KRAS Wild-type</i>	224	63%	190	64%	204	69%	152	65%
<i>KRAS mutato</i>	116	32%	107	36%	91	31%	64	27%
<i>Codone 12</i>	96	83%	90	84%	78	86%	55	86%
<i>Codone 13</i>	18	15%	15	14%	12	13%	8	13%
<i>Codone 61</i>	2	2%	2	2%	1	1%	1	1%
<i>Discordante</i>	/	/	/	/	/	/	18	8%
<i>NV</i>	2	2%	/	/	/	/	/	
<b>BRAF</b>								
<i>BRAF Wild-type</i>	349	97%	291	97%	289	96%	231	97%
<i>BRAF V600E</i>	11	3%	10	3%	8	3%	7	3%

**Tabella 4. Confronto tra le caratteristiche cliniche dei pazienti all WT, KRASmut, BRAFmut**

<b>Caratteristiche</b>	<b>All wt (N=213)</b>	<b>%</b>	<b>KRASm (N=116)</b>	<b>%</b>	<b>BRAFm (N=11)</b>	<b>%</b>	<b>p</b>
<b>Sesso</b>							
<i>Maschi</i>	143	67%	63	54%	7	64%	p=0.07
<i>Femmine</i>	70	53%	53	46%	4	36%	
<b>Età</b>							
<i>Mediana</i>	62		63		59		NA
<i>Range</i>	28-85		25-85		42-72		
<b>Performance status</b>							
<i>0</i>	186	87%	100	86%	7	64%	p=0.07
<i>1</i>	23	11%	16	14%	4	36%	
<i>2</i>	4	2%	0	0%	0	0%	
<b>Sede del tumore primitivo</b>							
<i>Colon destro</i>	36	17%	43	37%	7	64%	p<0.0001
<i>Colon sinistro</i>	120	56%	40	35%	2	18%	
<i>Retto extraperitoneale</i>	55	26%	33	28%	2	18%	
<i>Primitivi sincroni &gt;1</i>	2	1%	0	0%	0	0%	
<b>Presenza di malattia extraepatica</b>							
<i>Si</i>	199	93%	102	88%	10	91%	p=0.23
<i>No</i>	14	7%	14	12%	1	9%	
<b>Localizzazione delle metastasi epatiche</b>							
<i>Unilobari</i>	132	61%	73	63%	8	73%	p=0.77
<i>Bilobari</i>	81	38%	43	36%	3	27%	
<b>Presentazione delle metastasi</b>							
<i>Metacrona</i>	72	34%	35	30%	2	18%	p=0.48
<i>Sincrona</i>	141	66%	81	70%	9	82%	
<b>Tempo tra diagnosi delle metastasi e resezione</b>							
<i>0 mesi</i>	50	23%	21	18%	2	18%	NA
<i>≤6 mesi</i>	53	25%	29	25%	1	9%	
<i>&gt;6 mesi</i>	110	52%	66	57%	8	73%	
<b>Esito dell'intervento resettivo epatico</b>							
<i>R0</i>	178	84%	96	83%	9	82%	p=0.63
<i>R1</i>	18	8%	11	9%	1	9%	
<i>R2</i>	14	7%	7	6%	0	0%	
<i>Laparotomia esplorativa</i>	3	1%	2	2%	1	9%	

**Tabella 5. Trattamenti ricevuti prima e dopo la resezione epatica**

<b>Trattamenti sistemici pre-operatori (Pazienti trattati, N= 183)</b>		
<b>Chemioterapia e bevacizumab</b>	<b>116</b>	<b>63%</b>
FOLFOX/FOLFIRI+bevacizumab	69	
FOLFOXIRI+bevacizumab	47	
<b>Chemioterapia e anti-EGFR</b>	<b>18</b>	<b>10%</b>
FOLFOX/FOLFIRI +anti-EGFR	6	
FOLFOXIRI+anti-EGFR	12	
<b>Chemioterapia esclusiva</b>	<b>40</b>	<b>22%</b>
FOLFOX/FOLFIRI	35	
FOLFOXIRI	5	
<b>Altri trattamenti</b>	<b>9</b>	<b>5%</b>
<b>Trattamenti sistemici post-operatori (Pazienti trattati, N= 235)</b>		
<b>Chemioterapia e bevacizumab</b>	<b>74</b>	<b>32%</b>
<b>Chemioterapia e anti-EGFR</b>	<b>12</b>	<b>5%</b>
<b>Chemioterapia esclusiva</b>	<b>139</b>	<b>59%</b>
<b>Altri trattamenti</b>	<b>10</b>	<b>4%</b>

**Tabella 6. Analisi univariate: associazione tra caratteristiche clinico/patologiche dei pazienti con RFS ed OS**

	<i>N</i>	RFS Mediana, Mos (95%CI)	HR 95%CI	<i>P</i> * value	OS Mediana, mos (95%CI)	HR 95%CI	<i>P</i> * value
<b>Stato mutazionale</b>							
<i>all wt</i>	213	12.6	1	NA	60.7	1	NA
<i>KRAS mutati</i>	116	11.0	1.18 (0.90-1.56)	0.22	40.7	1.63 (1.12-2.39)	0.012
<i>BRAF mutati</i>	11	5.7	4.81(1.68-13.80)	0.003	21.0	7.74(2.11-28.46)	0.002
<b>Sesso</b>							
<i>Maschi</i>	226	12.6	1	0.41	54.0	1	0.50
<i>Femmine</i>	134	10.2	0.89 (0.70-1.16)		57.3	0.89 (0.23-1.65)	
<b>Età</b>							
<65	208	12.4	1	0.34	57.3	1	0.12
≥65	152	10.8	1.13 (0.88-1.45)		51.9	1.32 (0.93-1.87)	
<b>Performance Status</b>							
0	310	12.4	1	0.02	57.3	1	<0.0001
1-2	50	9.4	1.60 (1.09-2.36)		27.1	2.74 (1.65-4.65)	
<b>Sito del tumore primitivo</b>							
<i>Colon destro</i>	98	10.8	1	0.70	39.1	1	NA
<i>Colon sinistro</i>	168	12.3	1.13 (0.84-1.53)		57.3	1.53 (1.03-2.27)	0.035
<i>Retto extraperitoneale</i>	92	12.0	1.11 (0.80-1.55)		63.3	1.85 (1.23-2.76)	0.002
<b>Presenza di malattia extraepatica</b>							
<i>No</i>	330	12.6	1	0.003	57.3	1	0.003
<i>Si</i>	30	7.5	2.22 (1.31-3.75)		23.4	2.93 (1.43-6.00)	
<b>Localizzazione delle metastasi epatiche</b>							
<i>Unilobari</i>	227	15.0	1	0.0006	62.4	1	0.0003
<i>Bilobari</i>	133	8.0	1.60 (1.23-2.10)		34.4	1.91 (1.34-2.72)	
<b>Presentazione delle metastasi</b>							
<i>Metacrona</i>	115	15.0	1	0.03	57.3	1	0.16
<i>Sincrona</i>	245	10.8	1.33 (1.03-1.71)		52.8	1.28 (0.90-1.82)	
<b>Esito dell'intervento resettivo epatico</b>							
<i>R0</i>	300	14.2	1	<0.0001	61.1	1	<0.0001
<i>R1-2, Laparotomia esplorativa</i>	60	7.1	2.61 (1.76-3.87)		23.3	4.74 (2.83-7.94)	

	<i>N</i>	RFS Mediana, Mos (95%CI)	HR 95%CI	<i>P</i> * value	OS Mediana, mos (95%CI)	HR 95%CI	<i>P</i> * value
<b>Primitivo con linfonodi positivi</b>							
<i>No</i>	245	17.1	1	0.001	39.0	1	<0.0001
<i>Si</i>	107	10.6	1.54 (1.19-2.00)		10.6	2.37 (1.83-3.05)	
<b>Intervallo libero da malattia &lt;12 mesi</b>							
<i>Si</i>	282	17.1	1	0.02	62.4	1	0.13
<i>No</i>	78	10.8	1.39 (1.05-1.84)		52.8	1.36 (0.91-2.03)	
<b>Numero di metastasi epatiche &gt;1</b>							
<i>No</i>	154	16.3	1	<0.0001	65.7	1	0.0002
<i>Si</i>	200	9.2	1.68 (1.31-2.15)		38.7	1.88 (1.35-2.62)	
<b>Diametro delle metastasi &gt;5cm</b>							
<i>No</i>	267	11.7	1	0.54	59.0	1	0.20
<i>Si</i>	73	11.1	1.11 (0.80-1.52)		52.7	1.35 (0.85-2.13)	
<b>CEA&gt;200 ng/mL</b>							
<i>No</i>	246	11.0	1	0.32	52.7	1	0.003
<i>Si</i>	11	9.1	1.49 (0.68-3.27)		18.1	5.59(1.77-17.64)	
<b>Rischio di recidiva (score di Fong)</b>							
<i>Basso</i>	123	16.6	1	<0.0001	61.1	1	<0.0001
<i>Alto</i>	123	8.0	1.89 (1.38-2.57)		32.0	2.25 (1.51-3.37)	





**Tabella 7. Analisi multivariata: associazione tra caratteristiche clinico/patologiche dei pazienti con la RFS**

<b>Relapse Free Survival</b>			
<b>Caratteristiche dei pazienti</b>	<b>Adjusted HR</b>	<b>95%CI</b>	<b>P Value</b>
<b>Stato Mutazionale</b>			
<i>BRAF wt</i>	1	1.10-2.14	0.01
<i>BRAF mutati</i>	1.53		
<b>Performance Status</b>			
0	1	0.96-2.13	0.08
1-2	1.43		
<b>Presenza di malattia extraepatica</b>			
<i>Si</i>	1	0.43-1.17	0.19
<i>No</i>	0.72		
<b>Localizzazione delle metastasi epatiche</b>			
<i>Unilobari</i>	1	0.91-1.82	0.15
<i>Bilobari</i>	1.29		
<b>Presentazione delle metastasi</b>			
<i>Metacrona</i>	1	0.56-1.24	0.37
<i>Sincrona</i>	0.83		
<b>Esito dell'intervento resettivo epatico</b>			
<i>R0</i>	1	1.79-3.93	<0.0001
<i>R1-R2-Laparotomia esplorativa</i>	2.65		
<b>Rischio di recidiva (score di Fong)</b>			
<i>Basso</i>	1	1.10-2.37	0.01
<i>Alto</i>	1.62		

**Tabella 8. Analisi multivariata: associazione tra caratteristiche clinico/patologiche dei pazienti con l'OS**

<b>Overall Survival</b>			
<b>Caratteristiche dei pazienti</b>	<b>Adjusted HR</b>	<b>95%CI</b>	<b>P Value</b>
<b>Stato Mutazionale</b>			
<i>BRAF wt</i>	1	1.05-2.35	0.03
<i>BRAF mutati</i>	1.57		
<b>Performance Status</b>			
0	1	1.03-2.79	0.04
1-2	1.70		
<b>Sede del tumore primitivo</b>			
<i>Colon destroy</i>	NA	NA	0.07
<i>Colon sinistro</i>			
<i>Retto extraperitoneale</i>			
<b>Presenza di malattia extraepatica</b>			
<i>Si</i>	1	0.40-1.52	0.48
<i>No</i>	0.78		
<b>Localizzazione delle metastasi epatiche</b>			
<i>Unilobari</i>	1	0.94-2.25	0.09
<i>Bilobari</i>	1.45		
<b>Esito dell'intervento resettivo epatico</b>			
<i>R0</i>	1	2.38-6.34	<0.0001
<i>R1-R2-Laparotomia esplorativa</i>	3.88		
<b>Rischio di recidiva (score di Fong)</b>			
<i>Basso</i>	1	1.38-3.51	0.0010
<i>Alto</i>	2.20		

Figura 1 RFS nei gruppi BRAF WT e BRAF mutati

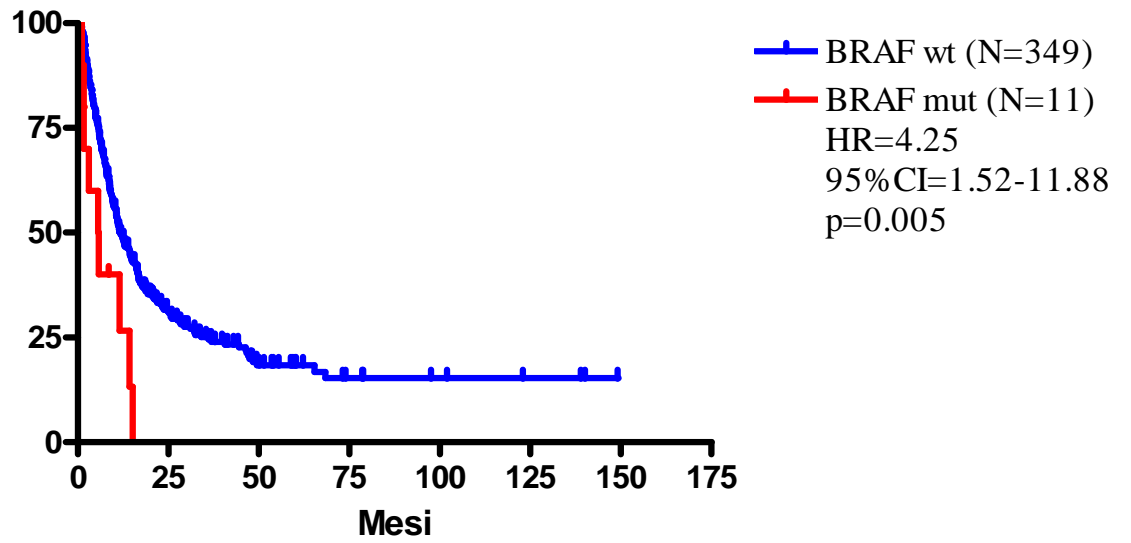


Figura 2. RFS nei gruppi all WT, KRAS mutati e BRAF mutati

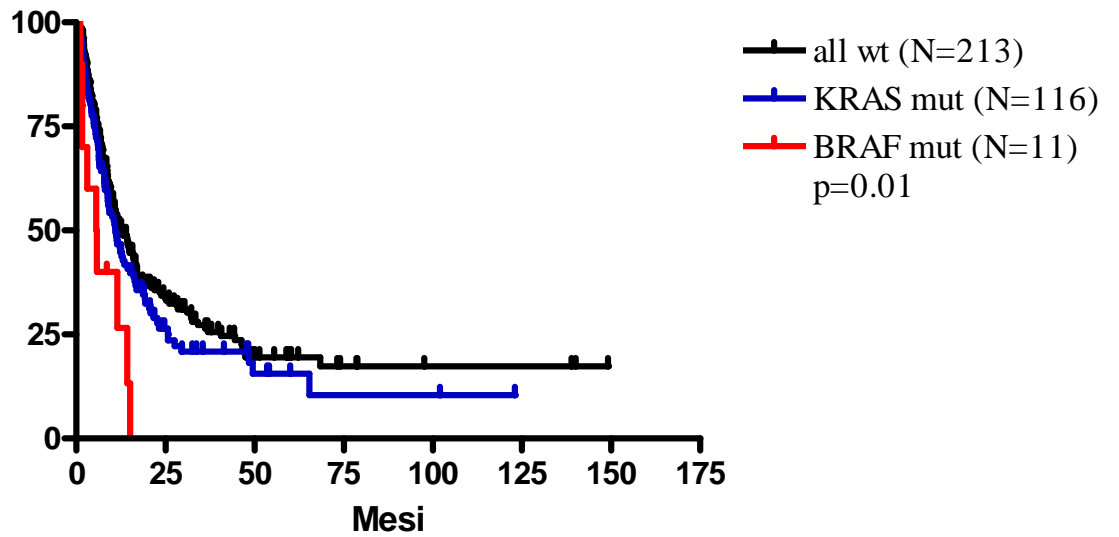
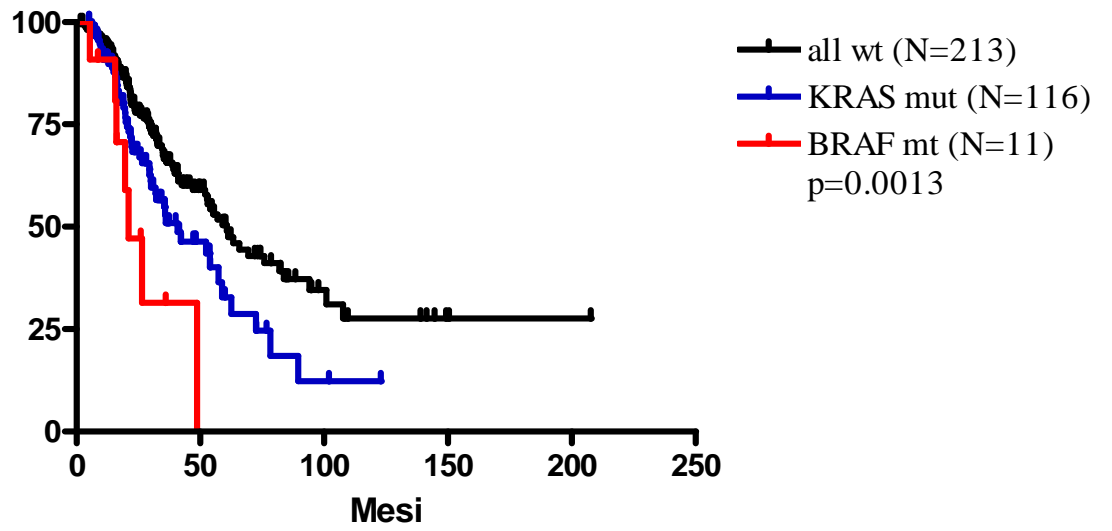


Figura 3. OS nei gruppi all WT, KRAS mutati e BRAF mutati



## **Bibliografia**

1. Jemal, A., F. Bray, M.M. Center, et al., Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011.61(2): p. 69-90
2. Ferlay, J., D.M. Parkin, and E. Steliarova-Foucher, Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*, 2010. 46(4): p. 765-81.
3. Jemal, A., M.M. Center, C. DeSantis, and E.M. Ward, Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010. 19(8): p.1893-907.3
4. Center, M.M., A. Jemal, and E. Ward, International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009. 18(6): p. 1688-94.
5. Center, M.M., A. Jemal, R.A. Smith, and E. Ward, Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin*, 2009. 59(6): p. 366-78.
6. Edwards, B.K., E. Ward, B.A. Kohler, et al., Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer*, 2010. 116(3): p. 544-73.
7. Berrino, F., G. Gatta, M. Sant, and R. Capocaccia, The EURO CARE study of survival of cancer patients in Europe: aims, current status, strengths and weaknesses. *Eur J Cancer*, 2001. 37(6): p. 673-7.8
8. Willett, W.C., Diet and cancer: one view at the start of the millennium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2001. 10(1): p. 3-8.
9. Linsalata, M. and F. Russo, Nutritional factors and polyamine metabolism in colorectal cancer. *Nutrition*, 2008. 24(4): p. 382-9.
10. Koohestani, N., T.T. Tran, W. Lee, T.M. Wolever, and W.R. Bruce, Insulin resistance and promotion of aberrant crypt foci in the colons of rats on a high-fat diet. *Nutr Cancer*, 1997. 29(1): p. 69-76.
11. Bruce, W.R., A. Giacca, and A. Medline, Possible mechanisms relating diet to colorectal cancer risk. *IARC Sci Publ*, 2002. 156: p. 277-81.
12. Bruce, W.R., A. Giacca, and A. Medline, Possible mechanisms relating diet and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2000. 9(12): p. 1271-9.
13. Moghaddam, A.A., M. Woodward, and R. Huxley, Obesity and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of 31 studies with 70,000 events. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007. 16(12): p. 2533-47.

14. Koohestani, N., M.C. Chia, N.A. Pham, et al., Aberrant crypt focus promotion and glucose intolerance: correlation in the rat across diets differing in fat, n-3 fatty acids and energy. *Carcinogenesis*, 1998. 19(9): p. 1679-84.
15. Giovannucci, E. and M.E. Martinez, Tobacco, colorectal cancer, and adenomas: a review of the evidence. *J Natl Cancer Inst*, 1996. 88(23): p. 1717-30.
16. Loftus, E.V., Jr., Epidemiology and risk factors for colorectal dysplasia and cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterol Clin North Am*, 2006. 35(3): p. 517-31.
17. Odze, R.D., Pathology of dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am*, 2006. 35(3): p. 533-52.
18. Eaden, J.A., K.R. Abrams, and J.F. Mayberry, The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*, 2001. 48(4): p. 526-35.
19. Xie, J. and S.H. Itzkowitz, Cancer in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 2008. 14(3): p. 378-89.
20. Imperiale, T.F., Aspirin and the prevention of colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2003. 348(10): p. 879-80.
21. Tsilidis, K.K., C. Branchini, E. Guallar, et al., C-reactive protein and colorectal cancer risk: a systematic review of prospective studies. *Int J Cancer*, 2008. 123(5): p. 1133-40.
22. Rapiti, E., G. Fioretta, H.M. Verkooyen, et al., Increased risk of colon cancer after external radiation therapy for prostate cancer. *Int J Cancer*, 2008. 123(5): p. 1141-5.
23. Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 1998. 396(6712): p. 643-9.
24. Lothe, R.A., P. Peltomaki, G.I. Meling, et al., Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res*, 1993. 53(24): p. 5849-52.
25. Vogelstein, B., E.R. Fearon, S.R. Hamilton, et al., Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med*, 1988. 319(9): p. 525-32.
26. Vogelstein, B., E.R. Fearon, S.E. Kern, et al., Allelotype of colorectal carcinomas. *Science*, 1989. 244(4901): p. 207-11.
27. Aaltonen, L.A., P. Peltomaki, F.S. Leach, et al., Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*, 1993. 260(5109): p. 812-6.
28. Ionov, Y., M.A. Peinado, S. Malkhosyan, D. Shibata, and M. Perucho, Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*, 1993. 363(6429): p. 558-61.
29. Kleibeuker, J.H., M.M. de Jong, I.M. Nolte, et al., Low-penetrance genes and their involvement in colorectal cancer susceptibility. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2002. 11(11): p. 1332-1352.

30. Kane, M.F., M. Loda, G.M. Gaida, et al., Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res*, 1997. 57(5): p. 808-11.
31. Cunningham, J.M., E.R. Christensen, D.J. Tester, et al., Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res*, 1998. 58(15): p. 3455-60.
32. Johns, L.E. and R.S. Houlston, A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol*, 2001. 96(10): p. 2992-3003.
33. Butterworth, A.S., J.P. Higgins, and P. Pharoah, Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *Eur J Cancer*, 2006. 42(2): p. 216-27.
34. Lynch, H.T. and A. de la Chapelle, Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2003. 348(10): p. 919-32.
35. Brosens, L.A., W.A. van Hattem, M. Jansen, et al., Gastrointestinal polyposis syndromes. *Curr Mol Med*, 2007. 7(1): p. 29-46.
36. Vasen, H.F., Clinical description of the Lynch syndrome [hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)]. *Fam Cancer*, 2005. 4(3): p. 219-25.
37. Lynch, H.T., J.F. Lynch, P.M. Lynch, and T. Attard, Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Fam Cancer*, 2008. 7(1): p. 27-39.
38. Debinski, H.S., S. Love, A.D. Spigelman, and R.K.S. Phillips, Colorectal polyp counts and cancer risk in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*, 1996. 110(4): p. 1028-1030.
39. Ambroze, W.L., Jr., G.R. Orangio, and G. Lucas, Surgical options for familial adenomatous polyposis. *Semin Surg Oncol*, 1995. 11(6): p. 423-7.
40. Nieuwenhuis, M.H., E.M. Mathus-Vliegen, G. Griffioen, et al., Genotype-phenotype correlations as a guide in the management of familial adenomatous polyposis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2007. 19(10): p. A23-A23.
41. Juhn, E. and A. Khachemoune, Gardner syndrome: skin manifestations, differential diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol*, 2010. 11(2): p. 117-22.
42. Hamilton, S.R., B. Liu, R.E. Parsons, et al., The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med*, 1995. 332(13): p. 839-47.
43. Spirio, L., S. Olschwang, J. Groden, et al., Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell*, 1993. 75(5): p. 951-7.
44. Spirio, L.N., W. Samowitz, J. Robertson, et al., Alleles of APC modulate the frequency and classes of mutations that lead to colon polyps. *Nat Genet*, 1998. 20(4): p. 385-8.



45. Knudsen, A.L., M.L. Bisgaard, and S. Bulow, Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature. *Fam Cancer*, 2003. 2(1): p. 43-55.
46. Lindblom, A., K.L. Robinson, T. Liu, et al., Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *Journal of the National Cancer Institute*, 2007. 99(4): p. 291-299.
47. Lynch, H.T. and J. Lynch, Lynch syndrome: genetics, natural history, genetic counseling, and prevention. *J Clin Oncol*, 2000. 18(21 Suppl): p. 19S-31S.
48. Vasen, H.F.A., P. Watson, J.P. Mecklin, H.T. Lynch, and I. Hnpcc, New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch Syndrome) proposed by the International Collaborative Group n HNPCC. *Gastroenterology*, 1999. 116(6): p. 1453-1456.
49. Boland, C.R., M. Koi, D.K. Chang, and J.M. Carethers, The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer*, 2008. 7(1): p. 41-52.
50. Beggs, A.D., A.R. Latchford, H.F. Vasen, et al., Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management. *Gut*, 2010. 59(7): p. 975-86.
51. Larsen Haidle, J. and J.R. Howe, Juvenile Polyposis Syndrome. 1993.
52. Linee guida AIOM 2012. Tumori del colon-retto
- 53 Smith, R.A., V. Cokkinides, D. Brooks, et al., Cancer screening in the United States, 2011: A review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin*, 2011. 61(1): p. 8-30.
54. Doran, J. and J.D. Hardcastle, Bleeding patterns in colorectal cancer: the effect of aspirin and the implications for faecal occult blood testing. *Br J Surg*, 1982. 69(12): p. 711-3.
55. Hardcastle, J.D., J.O. Chamberlain, M.H. Robinson, et al., Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. *Lancet*, 1996. 348(9040): p. 1472-7.
56. Kronborg, O., C. Fenger, J. Olsen, O.D. Jorgensen, and O. Sondergaard, Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. *Lancet*, 1996. 348(9040): p. 1467-71.
57. Faivre, J., V. Dancourt, C. Lejeune, et al., Reduction in colorectal cancer mortality by fecal occult blood screening in a French controlled study. *Gastroenterology*, 2004. 126(7): p. 1674-80.
58. Levin, B., D.A. Lieberman, B. McFarland, et al., Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA Cancer J Clin*, 2008. 58(3): p. 130-60.

59. Richter, S., Fecal DNA screening in colorectal cancer. *Can J Gastroenterol*, 2008. 22(7): p. 631-3.
60. Church, T.R., Screening for Colorectal Cancer--Which Strategy is the Best? *J Natl Cancer Inst*, 2011.
61. Kumar, V., A.K. Abbas, N. Fausto, S.L. Robbins, and R.S. Cotran, Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 8th ed. 2010, Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders.
62. Jass, J.R., L.H. Sobin, and B.C. Morson, Histological typing of intestinal tumours. 2nd ed. International histological classification of tumours. 1989, Berlin ; New York: Springer-Verlag.
63. Gagliardi, G., K.A. Stepniewska, M.J. Hershman, P.R. Hawley, and I.C. Talbot, New graderelatedprognostic variable for rectal cancer. *Br J Surg*, 1995. 82(5): p. 599-602.
64. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990. 61(5): p. 759-67.
65. Peifer, M. and P. Polakis, Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science*, 2000. 287(5458): p. 1606-9.
66. Mann, B., M. Gelos, A. Siedow, et al., Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoidenhancer- factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(4): p. 1603-8.
67. Taketo, M.M. and K. Takaku, Gastro-intestinal tumorigenesis in Smad4 mutant mice. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2000. 11(1-2): p. 147-57.
68. Abeloff, M.D., Abeloff's clinical oncology. 4th ed. 2008, Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier.
69. Cunningham, D., W. Atkin, H.J. Lenz, et al., Colorectal cancer. *Lancet*, 2010. 375(9719): p. 1030-47.
70. Copel, L., J. Sosna, J.B. Kruskal, et al., CT colonography in 546 patients with incomplete colonoscopy. *Radiology*, 2007. 244(2): p. 471-8.
71. Mainenti, P.P., M. Romano, M. Imbriaco, et al., Added value of CT colonography after a positive conventional colonoscopy: impact on treatment strategy. *Abdom Imaging*, 2005. 30(1): p. 42-7.
72. Brown, G., A.G. Radcliffe, R.G. Newcombe, et al., Preoperative assessment of prognostic factors in rectal cancer using high-resolution magnetic resonance imaging. *Br J Surg*, 2003. 90(3): p. 355-64.
73. Fioole, B., R.J. de Haas, D.A. Wicherts, et al., Additional value of contrast enhanced intraoperative ultrasound for colorectal liver metastases. *Eur J Radiol*, 2008. 67(1): p.169-76.

74. Ward, J., New MR techniques for the detection of liver metastases. *Cancer Imaging*, 2006. 6: p. 33-42.
75. Gonzalez-Moreno, S., L. Gonzalez-Bayon, G. Ortega-Perez, and C. Gonzalez-Hernando, Imaging of peritoneal carcinomatosis. *Cancer J*, 2009. 15(3): p. 184-9.
76. Sobin, L.H., M.K. Gospodarowicz, C. Wittekind, and International Union against Cancer., TNM classification of malignant tumours. 7th ed. 2010, Chichester, West Sussex, UK ;Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
77. Bertagnolli MM, Mahmoud NN, Daly JM et al. Surgical aspects of colorectal carcinoma. *Hematol/Oncol Clin North Am* 1997;11:655-677
78. Yada H, Sawai K, Taraguchi H et al. Analysis of vascular anatomy and lymph node metastases warrants radical segmental bowel resection for colon cancer. *World J. Surg* 1997;23: 109-115
79. Rodriguez-Bigas MA et al. Prophylactic colectomy for gene carriers in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: Has the time come?. *Cancer* 1996; 78: 199-201
80. Enker WE et al. Total mesorectal excision- the new golden standard of surgery for rectal cancer. *Ann Med* 1997; 29: 127-133
81. Bleday R et al. Local excision of rectal cancer. *World J. Surg* 1997;21: 706-714
82. [www.aiom.it/areapubblica/areamedica/prodottiscientifici/Lineeguida/tumoricolonretto/1979.0/](http://www.aiom.it/areapubblica/areamedica/prodottiscientifici/Lineeguida/tumoricolonretto/1979.0/)
83. Wolmark N, Fisher B, Rockette H, et al. Postoperative adjuvant chemotherapy or BCG for colon cancer: results from NSABP protocol C-01. *J Natl Cancer Inst* 1988;80:30-36
84. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, et al. Fluorouracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: a final report. *Ann Intern Med* 1995;122:321-326
85. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, et al. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med* 1990;322:352-358
86. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. *Lancet* 1995;345:939
87. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in B2 colon cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:1356
88. Thirion P, Michiels S, Pignon JP, et al. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: an updated metaanalysis. *J Clin Oncol* 2004;22:3766-3775
89. Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much?. *J Clin Oncol* 2004;22:1797-1806

90. Poplin EA, Benedetti JK, Estes NC, et al. Phase III Southwest Oncology Group 9415/Intergroup 0153 randomized trial of fluorouracil, leucovorin, and levamisole versus fluorouracil continuous infusion and levamisole for adjuvant treatment of stage III and high-risk stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:1819–1825
91. Meta-analysis Group In Cancer. Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:301–8
92. QUASAR Collaborative Group. Comparison of fluorouracil with additional levamisole, higher-dose folinic acid, or both, as adjuvant chemotherapy for colorectal cancer: a randomized trial. *Lancet* 2000;355:1588
93. Daniel Sargent, Evidence for Cure by Adjuvant Therapy in Colon Cancer: Observations Based on Individual Patient Data From 20,898 Patients on 18 Randomized Trials *J Clin Oncol* 27:872-877. 2009 by American Society of Clinical Oncology
94. Van Cutsem E, Twelves C, Cassidy J, et al. Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study. *J Clin Oncol* 2001;19:4097–4106
95. Twelves C, Wong A, Nowacki MP, et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med* 2005;352:2696–2704
96. de Gramont A, Figer A, Seymour M, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000;18:2938–2947
97. André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2343–2351
98. André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Bonetti A, Clingan P, Bridgewater J, Rivera F, de Gramont A. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol* 2009 Jul 1; 27:3109-311
99. Wolmark N, Wieand HS, Keubler JP, et al. A phase III trial comparing FULV to FULV +oxaliplatin in stage II or III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-07. *J Clin Oncol* 2005;23(suppl):16s. Abstract3500
100. Haller, et al., Adjuvant XELOX vs 5-FU/LV: XELOXA phase 3 trial *European Journal of cancer supplements*, Vol 7 No 2, September 2009 ECCO ESMO 2009
101. M. Bertagnolli, D. Niedzwiecki, Carolyn C., MSI predict a better response at adjuvant therapy, irinotecan, FU/AF in CRC stage III: protocol 89803 del Cancer and Leukemia Group B, *Journal of clinical oncology* Oct 2009, 2711-1814
102. Van Cutsem E, Labianca R, Hossfeld G, et al. Randomized phase III trial comparing infused irinotecan /5-fluorouracil (5-FU) / folinic acid (IF) versus 5-FU / FA (F) in stage III colon cancer patients (PETACC 3). *J Clin Oncol* 2005;23 (suppl):3s. Abstract 8

103. Carmen J. Allegra, Yothers G, Phase III Trial Assessing Bevacizumab in Stages II and III Carcinoma of the Colon: Results of NSABP Protocol C-08, 10.1200/JCO.2010.32.2701
- 104.; De Gramont et al. Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy as adjuvant treatment for colon cancer (AVANT): a phase 3 randomised controlled trial *Lancet Oncol* 2012; 13: 1225–33
- 105 D. Hughes, No benefit to cetuximab with adjuvant chemotherapy in resected stage 3 colon cancer
- 106 Saltz LB, Cox JV, Blanke C et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 343:905–914
107. Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R et al. Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil–leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18:136–147
- 108 Tomlinson JS, Jarnagin WR, De Matteo RP., Actual 10-year survival after resection of colorectal liver metastases defines cure. *J Clin Oncol* 25:4575-4580.
109. Adam et al., Rescue surgery for unresectable Colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy. *Ann Surg.* 2004 October; 240(4): 644–658.
110. Floriani I, Torri V, Rulli E., Performance of imaging modalities in diagnosis of liver metastases from colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis, *J Magn Reson imaging* 2010 Jan;31(1):19-31.
111. AHPBA consensus conference San Francisco 2006 *Ann Surg Oncol* 2006; 13: 1261-68)
112. Y. Fong, Joseph Fortner, Ruth L. Sun, Clinical Score for predicting recurrence after Hepatic resection for metastatic colorectal cancer, *Annals of surgery* No. 3, 309-321 1999
113. Cumming LC, Payes JD, Cooper GS, Survival after hepatic resection in metastatic colorectal cancer: a population-based study. *Cancer* 2007;109(4):718-726
114. Figueras J, Torras J, Valls C, et al. Surgical resection of colorectal liver metastases in patients with 501 patients. *Dis Colon Rectum.* 2007;50(4):478-488.
115. Simmond Pc, Primrose JN, Colquitt JL., Surgical resection of hepatic metastases from colorectal cancer: a Cochrane systematic review of published studies. *Br J Cancer* 94:982-999
116. Goslin R, Steele Jr G, Zamcheck N, Factors influencing survival in patients with hepatic metastases from adenocarcinoma of the colon or rectum. *Dis Colon Rectum* 25:749-754
117. Kokudo N. et al., Anatomical major resection versus nonanatomical limited resection for liver metastases from colorectal carcinoma. *Am J Surg* 181(2001);153-59

118. Portier et al., Multicenter Randomized Trial of Adjuvant Fluorouracil and Folinic Acid Compared With Surgery Alone After Resection of Colorectal Liver Metastases: FFCO ACHBTH AURC 9002 Trial. *J Clin Oncol* 2006; 24:4976-4982
119. Nordlinger et al., Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2008;22; 371(9617): 1007–1016
120. Folprecht G, Grothey A, Alberts S, Raab HR, Kohne CH. Neoadjuvant treatment of unresectable colorectal liver metastases: correlation between tumour response and resection rates. *Ann Oncol* 2005;16:1311-9
121. Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med*. 2000; 343(13): 905-14.
122. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, et al: Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: A multicentre randomised trial. *Lancet* 355: 1041-1047, 2000
123. Colucci G, Gebbia V, Paoletti G, et al. Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *J Clin Oncol*. 2005;23(22):4866–75.
124. Tournigand C, Andre T, Achille E, et al: FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: A randomized GERCOR study. *J Clin Oncol*. 2004 Jan 15;22(2):229-37. Epub 2003 Dec 2.
125. Falcone A, Masi G, Allegrini G et al. Biweekly chemotherapy with oxaliplatin, irinotecan, infusional Fluorouracil, and leucovorin: a pilot study in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20:4006-4014
126. Masi G, Allegrini G, Cupini S et al. First-line treatment of metastatic colorectal cancer with irinotecan, oxaliplatin and 5-fluorouracil/leucovorin (FOLFOXIRI): results of a phase II study with a simplified biweekly schedule. *Ann Oncol* 2004; 15:1766-72
127. Masi G, Cupini S, Marcucci L, et al. Treatment with 5-fluorouracil/folinic acid, oxaliplatin and irinotecan enables surgical resection of metastases in patients with initially unresectable metastatic colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2006; 13:58-65.
128. Falcone A, Ricci S, Brunetti I., Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol* 2007 May 1;25(13):1670-6
129. Masi G, Loupakis F, Pollina L., Long-term outcome of initially unresectable metastatic colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil/leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) followed by radical surgery of metastases. *Ann Surg* 2009 Mar;249(3):420-5

130. Masi G, Loupakis F, Salvatore L, et al: Bevacizumab with FOLFOXIRI as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2010; 11: 845-52
131. Falcone A, Loupakis F, Cupini S, et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab (BV) versus FOLFIRI plus BV as first-line treatment of metastatic colorectal cancer (MCRC): Preliminary safety results of the phase III randomized TRIBE study by the Gruppo Oncologico Nord-Ovest (GONO). *J Clin Oncol.* 2010;28:(15s; abstr 3543).
132. Falcone A., Cremolini C., Masi G., FOLFOXIRI/ bevacizumab versus FOLFIRI/beva as a first-line treatment in unresectable metastatic colorectal cancer patients: Results of the phase 3 TRIBE (TRIPlet+BEva) trial by GONO group), *J Clin Oncol* 31, 2013 (suppl; abstr 3505) 2013 ASCO GI
133. Gruenberger T., J. Bridgewater, Ian Chau, Randomized, phase 2 study of bevacizumab with mFOLFOX6 or FOLFIRI in patients with initially unresectable liver metastases from colorectal cancer: Resectability and safety in OLIVIA. *J Clin Oncol* 31, 2013 (suppl; abstr 3619) 2013 ASCO GI
134. Van Cutsem E NM, Lang I, Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS e BRAF mutation status. *J Clin Oncol.* 2011; 2011-2019
135. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009; 27(5): 663-71.
136. Garufi C, Torsello A, Tumolo S, et al. Cetuximab plus chronomodulated irinotecan, 5-fluorouracil, leucovorin and oxaliplatin as neoadjuvant chemotherapy in colorectal liver metastases:POCHER trial. *Br J Cancer.* 2010;103(10):1542–7.
137. Assenat E, Desseigne F, Thezenas S, et al. Cetuximab plus FOLFIRINOX (ERBIRINOX) as first-line treatment for unresectable metastatic colorectal cancer: a phase II trial. *Oncologist.* 2011;16(11):1557–64.
138. Folprecht G, Schuette K, Stoehlmacher J, et al. Cetuximab and FOLFOXIRI: Dose-escalation study in previously untreated patients with metastatic colorectal cancer. *Gastrointestinal Cancers Symposium Abstract* 480. 2010.
139. Fornaro L, Loupakis F, Lonardi S, et al.: Folfoxiri (irinotecan, oxaliplatin and infusional 5FU/LV) in combination with panitumumab (P) in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC) patients selected for KRAS, BRAF, NRAS and HRAS mutational status: a phase II study by the GONO group” *Eur J Canc.* 2011;47(S1): S420
140. Sorbye H et al. Patient characteristics and stratification in medical treatment studies for metastatic colorectal cancer: A proposal for standardization of patient characteristic reporting and stratification. *Ann Oncol* 2007; 18: 1666-172
141. D. J. Sargent, C. Henning, Pooled Safety and Efficacy Analysis Examining the Effect of Performance Status on Outcomes in Nine First-Line Treatment Trials Using Individual Data From Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 27:1948-1955. 2009

142. Grothey A, Sargent D, Goldberg RM, Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of Fluouracilleucovorin, irinotecan and oxaliplatin in the course of treatment. *J Clin Oncol* 2004; 22:1209-1214
143. Seymour MT et al. Different strategies of sequential and combination chemotherapy for patients with poor prognosis advanced colorectal cancer (MRC FOCUS): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 370: 143–52
144. Koopman M et al. Sequential versus combination chemotherapy with capecitabine, irinotecan, and oxaliplatin in advanced colorectal cancer (CAIRO): a phase III randomised controlled trial. *Lancet*. 2007 Jul 14;370(9582):135-42
145. Wagner AD, Arnold D., Grothey AA., Anti-angiogenic therapies for metastatic colorectal cancer, *Cochrane database syst rev*, 2009 Jul 8; (3)
146. Tebbutt NC, Wilson K, GebSKI VJ, et al. Capecitabine, bevacizumab, and mitomycin in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results of the Australasian Gastrointestinal Trials Group Randomized Phase III MAX Study. *J Clin Oncol*. 2010;28(19):3191–8.
147. Saunders M., Lang I., Marcuello E., Efficacy and safety according to age subgroups in AVEX, a randomized international phase 3 trial of bevacizumab in combination with capecitabine for the first-line treatment of elderly patients with mCRC, *J Clin Oncol* 31, 2013 (suppl; abstr 3521) ASCO GI 2013
148. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002;418: 934.
149. Harari PM, Allen GW, Bonner JA. Biology of interactions: antiepidermal growth factor receptor agents. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4057-4065.
150. D.C. Dykes, P. Brandt-Rauf, S.M. Luster, Activated conformations of the Ras-gene-encoded p21 protein: I. An energy-refine structure for the normal p21 protein complexed with GTP. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1992; 9: 1025-1044.
151. Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2005;6:322–7.
152. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaande Vries M, Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987;327:293–7.
153. Frattini M, Saletti P, Romagnani E et Al. PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2007; 97: 1139-45,
154. Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 1998;17:1395–413.
155. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins, Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417.



156. Tie J, Lipton Desai J., KRAS mutation is associated with lung metastasis in patients with curatively resected colorectal cancer *Clin Cancer Res* 2011; 17:1122-1130
157. Kim J., Lee S., Different metastatic pattern according to the KRAS mutational status and site-specific discordance of KRAS status in patients with colorectal cancer, *BMC Cancer* 2012, 12:347
158. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA.: "Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study." *J Natl Cancer Inst* 1998;90(9):675-84
159. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D et A. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 2001; 85: 692-696.
160. Phipps A., Buchanan D., Makar K., KRAS mutation status in relation to colorectal cancer survival: the joint impact of correlated tumour markers *British Journal of Cancer* (2013) 108, 1757-1764
- 

161. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer, *Cancer Res* 2006;66(8):3992-5.
162. Karapetis CS, Khambata-Ford S, K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008 Oct 23;359(17):1757-65.
163. Rafael G. Amado, Michael Wolf, Wild-Type KRAS Is Required for Panitumumab Efficacy in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 26(10) 2008 Apr 1
164. Hurwitz HL et al. The Clinical Benefit of Bevacizumab in Metastatic Colorectal Cancer Is Independent of K-ras Mutation Status: Analysis of a Phase III Study of Bevacizumab with Chemotherapy in Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer. *The Oncologist* 2009;14:22–28F
165. Tie J., "Optimizing targeted therapeutic development: analysis of a colorectal cancer patient population with the BRAF mutation"; *International journal of cancer*. 2011 May 1; 128 (9):2075-84
166. Ogino S, Brahmandam M, Cantor M, et al. Distinct molecular features of colorectal carcinoma with signet ring cell component and colorectal carcinoma with mucinous component. *Modern Pathology* 2006;19:59–68)
167. J Souglakos, Prognostic and predictive value of common mutations for treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer, *British Journal of Cancer* (2009), 1 –8 & 2009 Cancer Research UK 0007 – 0920/09
168. T Yokota et al., BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer *British Journal of Cancer* (2011) 104, 856–862 2011

- 
169. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2008;26:5705–12
170. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncology* 2010;11:753–62
171. Mao C, Liao RY, Qiu LX, Wang XW, Ding H, BRAF V600E mutation and resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *Molecular Biology Reports* 2011;38:2219–23
172. Ince WL et al. Association of k-ras, b-raf, and p53 Status With the Treatment Effect of Bevacizumab. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:981–9
173. Teng HW, Huang YC, Lin JK, BRAF mutation is a prognostic biomarker for colorectal liver metastasectomy. *J.Surg Onc* 2012 Aug 1;106(2):123-9.
174. Humeda Y., Nagasaka T., Mori Y., Poor prognosis of KRAS e BRAF mutant colorectal liver metastases without microsatellite instability *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 012-0531-9
175. Kemeny N., Chou F., Capanu M., Association of KRAS mutation with worse recurrence-free survival and site of metastatic progression after resection of hepatic colorectal metastases. *J Clin Oncol* 31, 2013 (suppl; abstr 3609)
176. Stremitzer S., Stift J., Gruenberger B., KRAS status and outcome of liver resection after neoadjuvant chemotherapy including bevacizumab *British journal of Surgery* November 2012 1575-1582
177. De Jong MC, Pulitano C., Ribero D, Rates and patterns of recurrence following curative intent surgery for colorectal liver metastasis. An international multi-institutional analysis of 1669 patients. *Ann. Surg.* 250, 440-448 (2009)

---

.









