



UNIVERSITÀ DI PISA

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale  
Direttore Prof. Mario Petrini

Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e dell'Area Critica  
Direttore Prof. Paolo Miccoli

Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia  
Direttore Prof. Giulio Guido

---

## CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA

“Studio esplorativo sul ruolo dei microRNA circolanti in  
pazienti affetti da carcinoma coloretale metastatico trattati  
con regorafenib”

RELATORE

Chiar.mo Prof. Alfredo Falcone

CANDIDATO

Sig. Beatrice Borelli

ANNO ACCADEMICO 2013/2014

## Indice

<b>Riassunto .....</b>	<b>3</b>
<b>Capitolo 1. Il tumore del colon retto .....</b>	<b>5</b>
1.1 Epidemiologia.....	5
1.2 Eziologia e fattori di rischio .....	7
1.3 Screening .....	12
1.4 Cenni di anatomia patologica .....	15
1.5 Clinica e modalità di diffusione .....	17
1.6 Stadiazione e diagnosi .....	20
1.7 Trattamento della malattia localizzata.....	25
1.7.1 Cenni di terapia chirurgica .....	25
1.7.2 Cenni di chemioterapia adiuvante .....	28
<b>Capitolo 2. Trattamento della malattia metastatica .....</b>	<b>33</b>
2.1 I farmaci citotossici: 5-fluorouracile, oxaliplatino, irinotecano.....	33
2.2 I farmaci biologici.....	37
2.2.1 Farmaci anti-angiogenetici .....	38
2.2.2 Farmaci Anti-EGFR: Cetuximab e Panitumumab .....	42
2.3 Scelta della strategia terapeutica nel paziente con mCRC .....	46
2.3.1 Terapia di prima linea .....	46
2.3.2 Linee successive.....	50
2.4 Regorafenib.....	52
<b>CAPITOLO 3: I miRNA circolanti nel carcinoma coloretale .....</b>	<b>59</b>
3.1 Generalità.....	59
3.2 Biosintesi dei miRNA.....	59
3.3 Ruolo dei miRNA nelle patologie tumorali.....	60
3.4 MiRNA circolanti come biomarkers.....	61
3.5 MiRNA nel carcinoma coloretale.....	63

<b>Capitolo 4. Studio esplorativo sul ruolo dei miRNA circolanti in pazienti affetti da carcinoma coloretale metastatico trattati con regorafenib.....</b>	<b>67</b>
4.1 Introduzione e rationale .....	67
4.2 Disegno e obiettivi dello studio .....	68
4.3 Materiali e metodi.....	69
4.3.1 Selezione dei pazienti .....	69
4.3.2 Raccolta dei campioni plasmatici e estrazione dei miRNA .....	70
4.3.3 Considerazioni statistiche .....	71
4.4 Risultati .....	72
4.5 Discussione.....	75
4.6 Conclusioni.....	79
<b>Tabelle e figure .....</b>	<b>80</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>90</b>

## **Riassunto**

Negli ultimi dieci anni la sopravvivenza mediana dei pazienti affetti da carcinoma coloretale metastatico (mCRC) è notevolmente migliorata, passando da circa 12 a più di 24 mesi, grazie all'introduzione di tecniche chirurgiche innovative e di nuove strategie terapeutiche che prevedono la combinazione di farmaci citotossici e farmaci biologici.

Nonostante questi progressi la malattia tumorale sviluppa inevitabilmente una resistenza alle terapie sebbene una discreta percentuale di pazienti siano in buone condizioni generali al momento della progressione. Sulla base dei risultati di un ampio studio di fase III è stato recentemente approvato un nuovo farmaco multitarget inibitore di chinasi coinvolte nell'angiogenesi e nella crescita tumorale, regorafenib. Ad oggi regorafenib è indicato nel trattamento di pazienti con mCRC in progressione di malattia dopo aver ricevuto tutte le altre terapie disponibili.

In una consistente percentuale di pazienti la malattia progredisce rapidamente entro le prime settimane di trattamento con regorafenib ed inoltre l'impiego di questo farmaco può determinare l'insorgenza di specifici effetti collaterali, talora gravi, oltre ad aumentare drasticamente i costi delle terapie. Per questi motivi la razionalizzare dell'impiego di tale farmaco, tramite l'identificazione di caratteristiche cliniche e/o biomolecolari che possano predire la risposta o la resistenza al trattamento è una necessità impellente.

Negli ultimi anni è stato ipotizzato che microRNA (miRNA) circolanti, piccole molecole lunghe appena 20 nucleotidi, possano condizionare la cancerogenesi dei tumori coloretali tramite la regolazione di oncosoppressori e oncogeni e possano avere un ruolo diagnostico, prognostico e/o predittivo.

Per questo ragioni abbiamo condotto uno studio esplorativo allo scopo di valutare l'andamento dei livelli plasmatici di 10 miRNA circolanti, scelti sulla base del loro già noto ruolo prognostico, in 34 pazienti con mCRC trattati con regorafenib presso il Polo Oncologico dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana. Le caratteristiche principali dei 34 pazienti trattati erano: rapporto maschi / femmine, 50% / 50%; età mediana, 65 anni (range 46-78), ECOG Performance Status 0 / 1-2, 71% / 29%; tempo intercorso tra diagnosi di malattia metastatica e trattamento con regorafenib < / 18 mesi, 65% / 35%. È stato osservato un tasso di risposta del 3% e una

stabilizzazione di malattia nel 47% dei casi. Ad un follow-up mediano di 9.1 mesi, la sopravvivenza libera da progressione (PFS) e la sopravvivenza globale (OS) mediane sono risultate, rispettivamente, di 2.4 e 6.5 mesi.

Complessivamente è stata osservato un incremento significativo dei livelli plasmatici mediani tra il primo e il quindicesimo giorno di terapia nei miR-601 ( $p=0.01$ ), miR-141 ( $p=0.04$ ) e miR-21 ( $p=0.06$ ). Nonostante l'incremento mediano osservato nella popolazione generale dei livelli circolanti di miR-21 al quindicesimo giorno, in 12 pazienti (35%) si è riscontrata una riduzione vs 22 pazienti (65%) in cui si è registrato un aumento. Correlando la variazione dei livelli di miR-21 con la risposta al trattamento si è verificato che: miR-21 si è ridotto in 3 dei 17 (18%) pazienti rapidamente progrediti al trattamento e in 9 dei 17 (53%) pazienti che hanno ottenuto una risposta o una stabilizzazione della malattia (Fisher's Exact Test,  $p=0.035$ ). Valutando i parametri standard di accuratezza di un test diagnostico, la misurazione dei livelli di miR-21 ha mostrato una sensibilità dell'82% e un valore predittivo negativo dell'75% nel predire il beneficio dal trattamento con regorafenib. La PFS e la OS mediane dei pazienti in cui è stata osservata una riduzione del miR-21 sono risultate rispettivamente di 3.9 e 7.8 mesi, mentre nei pazienti in cui il miR-21 è incrementato sono risultate di 2.1 e 5.8 mesi rispettivamente.

Questi dati trovano un forte razionale biologico, infatti miR-21 è un miRNA oncogenico che modula l'espressione di numerosi geni implicati nella progressione tumorale, tra i quali *PTEN* e *timidilato sintetasi*. E' iperespresso in numerose neoplasie e in particolare nel CRC elevati livelli di espressione sono stati associati a progressione di malattia e peggiore prognosi.

Questa analisi esplorativa identifica nella variazione precoce dei livelli plasmatici di miR-21 un potenziale marker predittivo di risposta al trattamento con regorafenib. I risultati ottenuti saranno verificati in uno studio prospettico ad oggi in corso.

## Capitolo 1. Il tumore del colon retto

### 1.1 Epidemiologia

Il tumore del colon-retto (CRC) a livello globale si colloca al terzo posto per incidenza nell'uomo e al secondo posto nella donna<sup>1</sup> e rappresenta da solo il 10% dei decessi per cancro<sup>2</sup>. Negli Stati Uniti è la terza neoplasia più frequente e la terza causa di morte per cancro sia per uomini che per le donne. L'incidenza globale si attesta a 39 casi ogni 100000 individui. Si stima che nel 2014 verrà posta diagnosi di neoplasia coloretale in circa 72000 uomini e 65000 donne e sono previsti circa 26000 e 24000 decessi per tale patologia rispettivamente nel sesso maschile e femminile<sup>3</sup>. In Europa è la seconda neoplasia più diffusa con 447000 casi nel 2012<sup>4</sup>.

L'incidenza e la mortalità variano in maniera sostanziale in base alla razza e all'etnia: incidenza maggiore è stata riportata nei paesi dell'Europa dell'Est, in Giappone, Nuova Zelanda, Australia e nella popolazione nera americana, mentre i tassi più bassi sono registrati in Africa, nell'America centrale e del sud e nei paesi sud asiatici. Negli ultimi anni i tassi di incidenza di CRC sono cresciuti nei paesi che storicamente presentavano un rischio minore (Giappone, Corea, Cina, paesi dell'Est Europa), tale aumento è verosimilmente dovuto alla diffusione della dieta e dello stile di vita occidentale. Dall'altro lato, nella scorsa decade (2001-10), negli Stati Uniti, l'incidenza globale si è ridotta di un 3.4% all'anno, ciò sembra essere dovuto all'efficacia dello screening del CRC, alla diagnosi precoce e alla rimozione delle lesioni precancerose.<sup>1,3</sup>

Per quanto riguarda la distribuzione della mortalità in relazione all'etnia nella popolazione nera la mortalità registrata è maggiore rispetto a quella della popolazione bianca (29 casi su 100000, contro 19 casi su 100000 rispettivamente).<sup>3</sup> In particolare i tassi continuano ad essere elevati nei paesi con risorse e strutture sanitarie limitate, come Messico, centro e sud America e Romania.<sup>5</sup> Quindi bassi livelli socioeconomici sono associati ad un aumento del rischio di incidenza e mortalità per carcinoma coloretale.<sup>6</sup>

A livello globale, la sopravvivenza a 5 anni del CRC oscilla tra il 28% e il 42% nei paesi in via di sviluppo, mentre supera il 60% negli Stati Uniti, Giappone e Svizzera.<sup>7</sup>

I tassi di sopravvivenza non presentano importanti variazioni in base al sesso. La sopravvivenza globale a 5 anni è leggermente superiore nei pazienti con tumore del retto (66.5%) rispetto al colon (64.2%), tuttavia questo riflette la percentuale maggiore di tumori del retto diagnosticati ad uno stadio localizzato (44% vs 38%), poiché la sopravvivenza ad ogni stadio è simile per quanto riguarda il retto e il colon. I pazienti di età inferiore a 65 anni hanno una sopravvivenza a 5 anni maggiore rispetto agli ultrasessantacinquenni (68.9% vs 62.0%); questo vantaggio, però è confinato ai tumori del colon distale e retto; la sopravvivenza per pazienti con tumori prossimali è la stessa per ciascun gruppo. Si rimanda al paragrafo 1.6 per i dettagli sulla sopravvivenza in relazione allo stadio di malattia.<sup>8</sup> I fattori che contribuiscono alle variazioni nella sopravvivenza sono l'accessibilità allo screening, la possibilità di ricevere un trattamento di qualità e le eventuali comorbidità.<sup>9</sup> Dalla metà degli anni '70 la sopravvivenza relativa per tutti gli stadi è aumentata dal 50.6% al 65.4% per il cancro del colon e dal 48.1% al 67.7% per il cancro del retto.<sup>10</sup> In particolare, nello stadio localizzato si è evidenziato il migliore incremento di sopravvivenza a 5 anni passando dal 55.2% al 73.0% per il colon e dal 45.2% al 69.2% per il retto grazie all'introduzione a partire dalla metà degli anni '80 della chemioterapia adiuvante.<sup>11</sup> Grandi progressi sono stati raggiunti anche per quanto riguarda la malattia metastatica, grazie al miglioramento delle tecniche di ablazione e radiofrequenza per l'asportazione delle metastasi epatiche<sup>12</sup>, e grazie all'introduzione di nuove terapie, e all'uso di indagini radiologiche per la diagnosi delle metastasi. Negli ultimi venti anni, i tassi di sopravvivenza a 1 e 2 anni dalla diagnosi di pazienti con malattia metastatica, sono cresciuti dal 35.9% al 52% e dal 16% al 33%.<sup>3</sup>

Approssimativamente il 60% dei casi e il 70% dei decessi avvengono in soggetti di età superiore ai 65anni. La probabilità nella vita di ricevere una diagnosi di CRC è del 4.7% per le donne e del 5.0% per gli uomini. Nel complesso i tassi di incidenza e mortalità risultano rispettivamente del 30% e del 40% maggiori negli uomini rispetto alle donne, anche se questa disparità varia con l'età. Il rapporto M:F risulta di 1.4 nella fascia di età tra 50 e 79 anni e di 1.2 per i soggetti di età superiore ad 80.<sup>3</sup> La ragione della maggior incidenza nell'uomo non è stata ancora completamente compresa, ma probabilmente è dovuta all'interazione di alcuni fattori eziologici con gli ormoni sessuali e all'esposizione a diversi fattori di rischio.<sup>13</sup>

Il cancro coloretale varia in termini di fattori di rischio, clinica e caratteristiche biologiche in base alla diversa localizzazione tra colon e retto, suggerendo una diversa eziologia e diversi meccanismi carcinogenetici.<sup>14</sup> Nonostante, la sede più frequente di CRC sia il colon prossimale (42%), seguito dal retto (28%), differenze di localizzazione peculiari sono state riscontrate anche in termini di sesso ed età. Le donne rispetto agli uomini hanno un maggior interessamento del colon prossimale (46% vs 38%) e una percentuale più bassa di tumori rettali (24% vs 31%). Ci sono inoltre differenze nella distribuzione per sito in base all'età della diagnosi, con un notevole incremento dei tumori prossimali e una riduzione dei tumori rettali nelle fasi di vita più avanzate.<sup>15</sup>

## **1.2 Eziologia e fattori di rischio**

La maggior parte dei carcinomi colon rettali insorge in forma sporadica, al di fuori di sindromi ereditarie ben definite. Nella carcinogenesi sono implicati fattori di rischio ambientali e genetici: tra i primi, sono sotto accusa le abitudini alimentari di tipo occidentale. Secondo molti studi gli immigrati provenienti da paesi a basso rischio assumono nel tempo lo stesso tasso di incidenza del paese di adozione, come è avvenuto alla popolazione giapponese in USA.<sup>2</sup> In particolare, i fattori alimentari che predispongono al CRC sono l'eccessivo introito calorico, un basso contenuto nella diete di fibre vegetali non assorbibili, un alto contenuto relativo di carboidrati raffinati, l'assunzione di carni rosse e il ridotto introito di micronutrienti protettivi. È stato ipotizzato che una dieta con poche fibre porti ad una massa fecale ridotta, ad un aumento nel tempo del transito fecale e ad un'alterazione della flora batterica intestinale. Ciò comporta un aumento nelle feci di prodotti ossidativi tossici, che risultano della degradazione dei carboidrati da parte dei batteri, e un loro prolungato contatto con la mucosa colica. L'assunzione di elevate quantità di colesterolo proveniente da carni rosse, aumenta la sintesi degli acidi biliari, che a loro volta possono essere convertiti in sostanze cancerogene dai batteri intestinali. Le diete ricche di prodotti raffinati contengono, inoltre, ridotte quantità di vitamine A, C ed E che esercitano un ruolo benefico rimuovendo i radicali liberi dell'ossigeno.<sup>16</sup> Anche un consumo eccessivo di alcool è associato ad un incremento del rischio di carcinoma colico, così come una dieta povera in acido folico e vit.B12. L'elevato e prolungato consumo di carne rossa lavorata è associato ad un aumento del rischio di incidenza

per quanto riguarda il colon distale, ed in particolare la giunzione retto sigmoidea e il retto. Al contrario l'abituale consumo di pesce e pollo è associata ad una lieve riduzione del rischio per il colon prossimale e distale, ma non per il retto.<sup>17</sup> Altri fattori di rischio comprendono l'inattività fisica e l'abitudine al fumo, il sovrappeso e l'obesità.<sup>2</sup> I risultati di diverse metanalisi che includono studi osservazionali rivelano un associazione tra il fumo di sigaretta e lo sviluppo di adenomi coloretali con tassi di rischio diversi e decrescenti se si considerano fumatori, ex-fumatori e fumatori occasionali;<sup>18</sup> studi recenti mostrano che i fumatori presentano un aumento del rischio di cancro rettale (RR=1.95 95%CI 1.10–3.47) ma non di quello colico.<sup>19</sup> Più di 50 studi osservazionali dimostrano che il regolare esercizio fisico riduce del 40% il rischio di CRC indipendentemente dal body mass index (BMI).<sup>20</sup> Il livello di attività intensità e frequenza e il mantenimento degli allenamenti nel tempo sembrano essere associati ad un importante riduzione del rischio. Studi di coorte e caso controllo hanno dimostrato un'associazione tra il grasso corporeo e il rischio di CRC. I risultati di una metanalisi, che comprende 23 studi di coorte e 8 studi caso controllo dimostra che l'obesità è un fattore di rischio diretto e indipendente del CRC;<sup>21</sup> in una ulteriore metanalisi l'aumentato rischio di CRC è stato attribuito ad elevati livelli di peptide C, di insulina e dei markers degli zuccheri plasmatici.<sup>22</sup>

Tra i fattori protettivi troviamo la vitamina D e l'introito di calcio che sembra correlato a un ridotto sviluppo di tumori del colon distale e del retto.<sup>23</sup> Molti studi epidemiologici suggeriscono inoltre che l'uso di aspirina e altri FANS eserciti un effetto protettivo nei confronti del carcinoma colico. Nel Nurses' Health Study, le donne che avevano assunto 4-6 compresse di aspirina/die per 10 anni o più hanno mostrato una ridotta incidenza di carcinoma del colon. Due studi hanno rivelato che l'aspirina riduce il rischio di recidiva degli adenomi in pazienti con precedenti carcinomi o adenomi colon rettali.<sup>24</sup> Il meccanismo di tale chemio-prevenzione non è stato ancora compreso, ma è probabilmente mediato dall'inibizione della ciclossigenasi-2 (COX-2). Questo enzima è iperespresso nell'epitelio neoplastico e sembra regolare l'angiogenesi e l'apoptosi. Sulla base di questi dati la Food and Drug Administration ha autorizzato negli Stati Uniti l'uso di inibitori di COX-2 nella chemio prevenzione dei carcinomi in pazienti affetti da FAP.<sup>16</sup>

Molti fattori genetici contribuiscono allo sviluppo del CRC, tra questi alcuni sono stati identificati come forme responsabili dei CRC ereditari. Tra le forme ereditarie le due

forme più comuni sono la Poliposi adenomatosa familiare (FAP) e la Sindrome non poliposica del Carcinoma colon rettale ereditario (HNPCC) o Sindrome di Lynch; la frequenza allelica di tali sindromi è rispettivamente di 1/10000 e di 1/350-1700.<sup>25</sup>

La FAP è una sindrome caratterizzata dalla presenza di numerosi adenomi colon rettali sin dall'età adolescenziale, provocata da mutazioni del gene *Adenomatous Polyposis Coli* (APC) a trasmissione autosomica dominante. Per la diagnosi sono necessari almeno 100 polipi intestinali; il 100% di questi soggetti, se non trattati, sviluppa CRC prima dei 30 anni di età, motivo per cui lo standard terapeutico è rappresentato dalla colectomia profilattica che tuttavia non modifica il rischio di sviluppare neoplasie in altre sedi ( tratto GI, in particolare in vicinanza dell' ampolla di Vater e nello stomaco). Esiste inoltre una forma attenuata in cui si sviluppa un numero inferiore di polipi e in età più avanzata e il rischio di sviluppare una neoplasia colica si attesta intorno ai 50 anni. La FAP comprende anche manifestazioni extra intestinali come l'ipertrofia congenita dell'epitelio del pigmento retinico, che può aiutare nella diagnosi precoce. Specifiche mutazioni di *APC*, sono responsabili delle varianti di FAP, tra queste la Sindrome di Gardner è caratterizzata da osteomi mandibolari, cranici e delle ossa lunghe, cisti epidermiche, tumori desmodi, tumori della tiroide e anomalie della dentatura, mentre la Sindrome del Turcot, più rara, è caratterizzata da adenomi intestinali e tumori del SNC. Alcuni pazienti, infine, sono affetti da FAP senza perdita di *APC*, ma presentano mutazioni del gene di riparazione di escissione delle basi, *MUTYH*.

La Sindrome di Lynch (LS) è un'altra importante causa di CRC ereditario, caratterizzata da un aumento dell'incidenza familiare di tumori in diverse sedi; in ordine di frequenza abbiamo il colon, l'endometrio, lo stomaco, le ovaie, gli ureteri, il cervello, l'intestino tenue, le vie epatobiliari e la cute. In questi pazienti i tumori del colon compaiono in età più giovane rispetto agli sporadici, e sono spesso localizzati al colon destro.<sup>16</sup>

La diagnosi viene posta in base ai criteri di Amsterdam I e II (modificati nel 1999):

- diagnosi di CRC (o di tumori extracolici associati alla LS) prima dei 50anni di età,

- 3 o più familiari, di cui almeno uno di primo grado, affetti da CRC o tumori dello spettro della LS ,
- almeno due generazioni successive devono essere affette,
- conferma istologica della neoplasia,
- esclusa diagnosi di FAP. <sup>26</sup>

I geni del mismatch repair (MMR) codificano per proteine necessarie all'identificazione, escissione e riparazione degli errori che si verificano durante la replicazione del DNA. La mutazione acquisita di questi geni è responsabile di una parte dei tumori sporadici, mentre le mutazioni ereditarie causano la LS. Il complesso del MMR è formato da 5 geni: *MSH2*, *MLH1*, *PMS1*, *PMS2* e *MSH6*; nel 60% dei casi la mutazione riguarda *MSH2* (regione cromosomica 2p) e *MLH1* (regione cromosomica 3p); più raramente sono coinvolti i geni *PMS1* (regione cromosomica 2q), *PMS2* (regione cromosomica 7p) e *MSH6*. I pazienti affetti da LS ereditano un allele normale e uno mutato, quando una mutazione o un silenziamento epigenetico comportano la perdita della seconda copia di uno dei geni MMR, si determina la cosiddetta *instabilità dei microsatelliti (MSI)*; si verifica cioè, un accumulo di mutazioni durante la replicazione del DNA, responsabile dalla ripetizione di brevi sequenze di DNA (DNA microsatelliti) a livello di regioni codificanti del genoma. In condizioni normali, i microsatelliti sono brevi sequenze (1-6 paia di basi) di DNA non codificante, variamente ripetute a tandem lungo l'intero genoma; costituiscono il 3% del materiale genetico, presentano un alto livello di polimorfismo interindividuale che permette la creazione di impronte genetiche, utilizzabili per identificare un individuo o effettuare studi di popolazione.<sup>27</sup> In sostanza la presenza di MSI è l'espressione fenotipica dell'alterazione dei geni MMR. Quando si verifica un difetto del sistema del MMR, a causa di una mutazione somatica o ereditaria, l'insorgenza di MSI causa l'inattivazione di oncosoppressori o modifica alcune sequenze non codificanti. Le mutazioni rendono silenti regioni codificanti o promotrici dei geni coinvolti nella regolazione della crescita cellulare, come ad esempio il recettore TGF  $\beta$  di tipo II e la proteina proapoptotica BAX.

Nei tumori con MSI sono frequenti le mutazioni dell'oncogene *BRAF* e il silenziamento del gene *MLH1* dovuto all'ipermetilazione di CpG, mentre in genere *KRAS* e *p53* non presentano mutazioni. Di conseguenza la combinazione di

instabilità dei microsatelliti, mutazioni di *BRAF*, e la metilazione di bersagli specifici, come MLH1, costituisce la firma di questa via di carcinogenesi.<sup>28</sup>

Le neoplasie coloretali possono essere distinte in tumori con microsatelliti stabili (MSS) o con MSI: riferendoci all'ultima categoria è possibile distinguere ulteriormente neoplasie MSI-High (MSI-H) o MSI-Low (MSI-L) in base al valore della percentuale dei loci mutati (>/< 30%). I tumori MSI-H mostrano una marcata differenziazione mucinosa e infiltrati linfocitari peritumorali, si sviluppano con maggior frequenza nel colon destro e presentano un vantaggio prognostico del 15% rispetto alle altre categorie.<sup>16</sup> Mentre le caratteristiche cliniche e molecolari dei tumori MSI-L sono paragonabili a quelle dei tumori MSS.<sup>29</sup>

Per quanto riguarda i tumori sporadici da molti anni è noto che l'accumulo di alterazioni genetiche determina una progressiva disregolazione dei processi di proliferazione cellulare, responsabili delle modifiche morfologiche della cellula epiteliale.<sup>30</sup>

La combinazione di eventi molecolari che determinano l'adenocarcinoma del colon sporadico, è molto varia e comprende anomalie genetiche ed epigenetiche, riscontrate anche nei tumori ereditari. Sono state descritte almeno due vie patogenetiche distinte: la prima è la *via APC/b catenina*, associata alla classica sequenza adenoma-carcinoma; la seconda è la *via dell'instabilità dei micro satelliti*, precedentemente trattata. Entrambe implicano il graduale accumulo di mutazioni multiple, ma differiscono per i geni coinvolti. Gli eventi epigenetici, il più comune dei quali è il silenziamento genico indotto da metilazione, possono accelerare la progressione lungo entrambe le vie.<sup>16</sup> La classica sequenza adenoma-carcinoma è implicata nello sviluppo di circa l'80% dei CRC sporadici. Il primo evento della via è rappresentato dalla mutazione del gene *APC*, che causa la sintesi in forma tronca della proteina APC; suddetta proteina, in condizioni fisiologiche, lega i fasci di microtubuli, favorisce la migrazione, l'adesione cellulare e regola i livelli di  $\beta$ -catenina. Quest'ultima legando i recettori della caderina ai filamenti di actina del citoscheletro, svolge un'importante funzione di adesione cellulare e coinvolta nella via di segnalazione *Wnt*. L'attivazione o inibizione della via APC/  $\beta$ -catenina dipende principalmente dal legame di Wnt con il suo recettore sulla membrana plasmatica. Quando Wnt è presente la  $\beta$ -catenina si stacca dal complesso APC, trasloca nel nucleo e trascrive specifici geni che promuovono la proliferazione, se invece Wnt non

è presente lo stesso complesso induce la degradazione di  $\beta$ -catenina da parte del proteasoma. A causa della mutazione del gene *APC* (cromosoma 5q), si ha un accumulo di  $\beta$ -catenina e una migrazione della stessa nel nucleo, dove interferendo con alcuni fattori di trascrizione, promuove la proliferazione cellulare e inibisce l'apoptosi. Questa fase è seguita da ulteriori mutazioni, tra queste svolgono un ruolo di fondamentale importanza le mutazioni attivanti *RAS*, proto-oncogene che codifica per una proteina di legame posta a valle dell'epidermal growth factor receptor (EGFR); in situazioni fisiologiche il legame di EGFR al fattore EGF o al TGF  $\alpha$  causa l'attivazione delle proprietà tirosin chinasiche del recettore di membrana, a cui segue l'attivazione della proteina citoplasmatica RAS, responsabile a sua volta della differenziazione e proliferazione cellulare; in presenza della mutazione di *RAS* la cellula è sottoposta ad uno stimolo proliferativo costante per l'attivazione costitutiva della cascata di segnale a valle di EGFR.<sup>31</sup> La progressione neoplastica è associata anche alla mutazione di altri oncosoppressori, come quelli che codificano per le proteine SMAD2 E SMAD4 (cromosoma 18q), attuatori della segnalazione di TGF  $\beta$ ; la perdita di questi geni può consentire la crescita cellulare incontrollata.<sup>32</sup> L'oncosoppressore *p53* (cromosoma 17p) risulta mutato nel 70-80% dei tumori del colon; la perdita di funzione di questi oncosoppressori è spesso causata da delezioni cromosomiche o in alternativa possono essere silenziati dalla metilazione di una zona ricca di CpG (isola CpG), regione che comprende il promotore e il sito di inizio della trascrizione.

Esiste poi un terzo gruppo di CRC caratterizzati da un aumento della metilazione dell'isola CpG, in assenza di instabilità dei microsatelliti. Molti di questi tumori presentano mutazioni di *KRAS*, mentre le mutazioni di *p53* e *BRAF* sono piuttosto rare.<sup>16</sup>

### 1.3 Screening

La prevenzione secondaria consiste nella diagnosi precoce di una specifica neoplasia, è fondamentale per poter impostare tempestivamente una terapia adeguata ed ha come fine ultimo la riduzione della mortalità specifica per tumore. Tale intervento ha un peso particolarmente importante nel carcinoma colon-rettale, non in tutte le neoplasie infatti esiste questa correlazione; numerosi studi dimostrano

come la mortalità cancro-correlata possa diminuire del 50% all'anno grazie alla diagnosi precoce. Lo screening del CRC è vantaggioso in termini di rapporto costo/beneficio, in quanto:

- Il CRC è un tumore frequente, ad elevata mortalità e con lunga fase pre-clinica, che è utile per identificare la neoplasia quando ancora non è avanzata.
- La diagnosi precoce in questo tipo di neoplasia è effettivamente la miglior cura
- Sono disponibili a questo scopo test sensibili, specifici (fondamentali per evitare di allarmare in modo ingiustificato il paziente), economici, semplici e relativamente invasivi.<sup>33</sup>

I test disponibili per lo screening sono la ricerca del sangue occulto fecale (RSO) o l'endoscopia. Le strategie devono considerare il rischio della popolazione da esaminare, il segmento di intestino a maggior rischio, il costo-efficacia, la "compliance" e la disponibilità delle tecnologie. Ognuna delle strategie proposte presenta problemi, relativamente al livello di adesione, alla frequenza con cui proporre il test e all'età in cui iniziare lo screening.<sup>34</sup> La ricerca del sangue occulto nelle feci tramite Guaiac (Hemoccult II) è una delle metodiche più utilizzate per la sua facile esecuzione, alta compliance e scarso costo; tuttavia l'indagine è caratterizzata da una discreta percentuale di falsi positivi e di falsi negativi (mancato riconoscimento di lesioni neoplastiche o pre-neoplastiche in quanto non sanguinanti). La positività del test deve essere seguita da una conferma endoscopica. In alternativa, per la ricerca del sangue occulto nelle feci è possibile utilizzare una metodica immunologica, basata sull'uso di anticorpi contro il sangue umano il FITtest; la tecnica non è influenzata da farmaci né da alimenti e necessita di uno, al massimo due campioni fecali.<sup>33</sup> Studi recenti dimostrano una maggiore sensibilità nella diagnosi del CRC rispetto all' Hemoccult.<sup>35</sup>

Un'ulteriore tecnica, capace di identificare le alterazioni molecolari presenti nelle cellule di adenomi e carcinomi, è rappresentata dal test del DNA fecale (SDNA test). L'esame non è invasivo, non prevede restrizioni dietetiche o l'interruzione di farmaci, né una preparazione intestinale, ma gli elevati costi limitano la sua applicazione.<sup>36</sup>

La sigmoidoscopia con strumento flessibile permette di esaminare la mucosa colica fino a 60cm dal margine anale (retto, sigma e parte del colon discendente). L'esame è effettuato dopo una preparazione del colon tramite lassativi. In caso di positività è necessario effettuare una colonscopia.<sup>37</sup>

La colonscopia, invece, permette di valutare l'intera mucosa del colon ed è considerata completa quando viene raggiunta la valvola ileo-cecale, questo test non solo favorisce la diagnosi negli stadi precoci ma permette anche di resecare i polipi intestinali.<sup>38</sup> È indicata come tecnica primaria di screening nei pazienti ad alto rischio,<sup>39</sup> è invece utilizzata come esame di secondo livello dopo un RSO positivo nella popolazione a basso rischio.

In generale la colonscopia ha una maggiore sensibilità diagnostica a scapito di una ridotta accettabilità, la sigmoidoscopia è meno aggressiva ed ha una migliore compliance, ma non identifica circa il 30%-40% delle lesioni; il sangue occulto è senza dubbio la metodica più accettabile, ma ha bassa sensibilità e deve essere ripetuto, come minimo, ogni due anni perchè lo screening risulti efficace.<sup>40</sup> I marcatori fecali e la colonscopia virtuale sono ancora considerate metodiche sperimentali.<sup>41 42</sup>

Le indicazioni sulla modalità di screening non sono univoche e va considerato che in molte regioni italiane sono attivi dei programmi di screening operanti con diverse modalità.

È necessario suddividere la popolazione in diversi gruppi di rischio, al fine di applicare in tempi diversi le tecniche di screening più appropriate. I fattori che definiscono un paziente ad elevato rischio sono:

- Storia personale di polipo adenomatoso del colon-retto
- Storia personale di carcinoma del colon-retto
- Rilevante storia familiare di carcinoma colo-rettale o di polipi adenomatosi, in particolare nell'ambito della LS e della FAP
- Storia personale di malattia infiammatoria cronica (rettocolite ulcerosa o malattia di Crohn)<sup>39</sup>

I pazienti con polipi adenomatosi devono essere sottoposti alla rimozione e avviati allo screening con la colonscopia da effettuare dopo un lasso di tempo, dalla data della rimozione, variabile in base numero e alle caratteristiche cliniche dei polipi (da 2/6mesi, a 3 anni o 5anni).

I pazienti con diagnosi personale di CRC devono effettuare una colonscopia prima della chirurgia (se non eseguibile, per occlusione, 3-6 mesi dopo l'intervento) e dopo 12 mesi dall'intervento. Se l'esame risulta negativo può essere ripetuto dopo 3 anni e poi dopo 5 anni.

I soggetti con diagnosi di carcinoma del colon-retto o di polipi adenomatosi in un familiare di primo grado di età <60 anni o in 2 o più parenti di primo grado a qualsiasi età (non sindrome ereditaria) vengono sorvegliati con una prima colonscopia a 40 anni o 10 anni prima dell'età del familiare più giovane alla diagnosi; le indagini se negative possono essere ripetute ogni 5anni.

I familiari di primo grado di pazienti con diagnosi di CRC o polipi adenomatosi in età >60 anni o con almeno 2 parenti di secondo grado di qualsiasi età, sono avviati al percorso standard di screening.

Nei soggetti con FAP e Sindrome di Lynch è indicata la colonscopia rispettivamente a partire dai 10-12 anni e 25 anni ogni 1-2anni, tale indicazione è valida anche per i soggetti affetti da malattie infiammatorie croniche.<sup>34</sup>

Studi recenti dimostrano che lo screening nei pazienti con FAP e LS riducono l'incidenza e la mortalità per CRC.<sup>43</sup>

#### **1.4 Cenni di anatomia patologica**

I carcinomi coloretali sono neoplasie invasive che originano come lesioni in situ dell'epitelio mucoso intestinale e possono evolvere con diverse modalità morfologiche.<sup>16</sup> E' dimostrato che gli adenomi possono essere i precursori dei carcinomi coloretali invasivi, sebbene solo il 10% degli adenomi ha un'evoluzione carcinomatosa; il rischio aumenta all'aumentare del numero dei polipi, per lesioni di dimensioni > 2cm, 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), i tumori del colon distale invece originano più frequentemente da polipi, raggiungono la parete intestinale e si accrescono circonferenzialmente dando luogo ad una proliferazione di fibroblasti e produzione di collagene (reazione desmoplastica) che può determinare una retrazione cicatriziale del lume intestinale; queste lesioni vanno rapidamente incontro ad erosione superficiale e ulcerazione.<sup>44</sup>

Dal punto di vista microscopico distinguiamo, sulla base della classificazione istologica della World Health Organization:

- *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.

Gli adenocarcinomi costituiscono l'istotipo più frequente (95%), le altre forme coprono nell'insieme il 5% dei carcinomi coloretali.<sup>45</sup>

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*: neoplasie ben differenziate, caratterizzate da cellule cilindriche simili alla loro controparte adenomatosa, che invadono la sottomucosa e la tonaca muscolare propria;
- *grado 2*: neoplasie moderatamente differenziate;
- *grado 3*: neoplasie scarsamente differenziate;
- *grado 4*: neoplasie anaplastiche, prive di strutture ghiandolari

Parametri istologici importanti nella caratterizzazione dei CRC, anche nella determinazione delle scelte terapeutiche, sono l'invasione linfovascolare 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>46</sup>

### **1.5 Clinica e modalità di diffusione**

Nella maggior parte dei casi i CRC in fase iniziale sono asintomatici o presentano una sintomatologia aspecifica. Si possono distinguere vari quadri clinici in base alla sede, all'estensione locale e/o a distanza e alle complicanze. <sup>47</sup>

La maggior parte delle neoplasie coinvolge il retto e il sigma (40%). Le lesioni del *colon destro* sono generalmente voluminose e ulcerate, e sono associate ad una perdita ematica cronica e insidiosa; a questo livello il contenuto intestinale è ancora liquido, quindi le neoplasie del cieco e colon ascendente possono accrescersi senza determinare sintomi ostruttivi o alterazioni degne di nota dell'alvo; questi pazienti presentano spesso calo ponderale e astenia, riferibile ad un'anemia ipocromica microcitica dovuta alla carenza di ferro. La lesione può sanguinare in modo intermittente per questo la RSO può essere negativa; pertanto la presenza inspiegabile di anemia sideropenica in ogni adulto, obbliga ad un'accurata

visualizzazione endoscopica e/o radiologica dell'intero intestino crasso. Lesioni in questa sede possono determinare un dolore di tipo gravativo, non molto intenso, sub continuo localizzato nei quadranti addominali di destra e talora nell'epigastrio; si può accompagnare inoltre, ad una vaga sintomatologia dispeptica.

I tumori che insorgono a livello del *colon sinistro* tendono ad impedire il passaggio delle feci, determinando l'insorgenza di crampi addominali, e in fase avanzata possono determinare più frequentemente, rispetto alle lesioni destre, quadri di occlusione (10%) e/o perforazione intestinale (5%). Le radiografie dell'addome spesso evidenziano caratteristiche lesioni anulari costringenti (a "torsolo di mela"). Le modificazioni dell'alvo sono spesso minime e progressive, caratterizzate da stipsi o da diarrea, ma in genere i due sintomi si alternano; solitamente si verifica un primo episodio diarroico al mattino presto, il materiale evacuato può essere abbondante e misto a muco e sangue, gli episodi tendono a ripetersi nell'arco della giornata. Il dolore addominale è spesso di tipo intermittente, di intensità variabile, localizzato prevalentemente ai quadranti sinistri o diffuso a tutto l'addome, ed è correlabile alla contrazione della muscolatura colica a monte della stenosi, volta a far progredire il contenuto intestinale. Qualora il dolore sia continuo, sordo, gravativo è riferibile all'infiltrazione della parete intestinale; si tratta di sintomo tardivo dovuto all'infiltrazione dei plessi nervosi.

Le neoplasie del *retto* sono prevalentemente vegetanti e ulcerate; si distingue una diversa sintomatologia in base alla localizzazione sovrapollare, ampollare o sottoampollare; i primi sono responsabili di quadri clinici sovrapponibili a quelli descritti per il colon sinistro. Nelle neoplasie ampollari prevalgono invece, tenesmo, con senso di peso e di corpo estraneo, talora accompagnato da dolore gravativo; può inoltre manifestarsi rettorragia associata a mucorrea. Infine nelle forme sottoampollari, a rapida evoluzione verso la stenosi, possiamo avere evacuazione di feci nastriformi, miste a muco e sangue. Possono inoltre essere presenti tenesmo e dolore perianale/perineale, che si accentua durante la defecazione.<sup>48</sup> Le lesioni in questa sede entrano in diagnosi differenziale con lesioni emorroidarie, e la presenza di rettorragia e/o modifiche dell'alvo richiede una esplorazione digitale del retto e una rettosigmoidoscopia.<sup>49</sup>

I sintomi del CRC si presentano solo in un 40% dei casi, e si tratta spesso di quadri vaghi e aspecifici che i pazienti tendono a sottovalutare; ne deriva quindi una diagnosi tardiva. Il 25% delle diagnosi avviene in fase metastatica di malattia, in questa fase un dolore in ipocondrio destro attribuibile ad epatomegalia può essere l'unica manifestazione della malattia.

Le neoplasie intestinali presentano diverse modalità di diffusione:

- per continuità (caratterizzata da infiltrazione neoplastica nella parete intestinale con estensione lungo la parete dell' organo),
- per contiguità (cioè l'infiltrazione di organi circostanti, con possibili fistole in stomaco, vagina e vescica),
- per via endocavitaria (con possibile carcinosi peritoneale),
- per via linfatica ed ematica.<sup>50</sup>

La diffusione per continuità si verifica lungo l'asse trasversale, longitudinale e circumferenziale del viscere, con invasione successiva dei diversi strati della parete intestinale, del grasso pericolico, degli organi e delle strutture adiacenti; dopo aver superato la sierosa è possibile, per fenomeni di esfoliazione cellulare, la colonizzazione neoplastica del peritoneo (carcinosi peritoneale).<sup>48</sup>

La diffusione ematica avviene soprattutto tramite il sangue portale dato che il colon e retto sono in massima parte tributari delle vene mesenteriche; il fegato quindi è l'organo più frequentemente interessato, seguito dal polmone. Il retto inferiore è tributario della circolazione sistemica attraverso le vene emorroidarie inferiori e medie; per questo sono più frequenti metastasi polmonare senza interessamento epatico rispetto a quanto avviene per il colon. Talora sono state riscontrate anche metastasi vertebrali per anastomosi con il plesso venoso vertebrale.

La diffusione linfatica in base alla localizzazione primaria del tumore può interessare i linfonodi epicolici addossati alla parete intestinale, i paracolici situati sul margine mesenterico, gli intermedi lungo il decorso delle arterie coliche e i 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.<sup>50</sup>

## **1.6 Stadiazione e diagnosi**

La prognosi nei soggetti con cancro coloretale dipende dal grado di invasione tissutale locale, dall'infiltrazione degli organi vicini e dalla presenza di metastasi linfonodali o ad altri organi. Esistono diversi sistemi di stadiazione; la classificazione attualmente presente negli Stati Uniti ed in Europa corrisponde a quella di Dukes modificata da Astler-Coller nel 1954 e, successivamente, da Turnbull nel 1967.

### **Stadiazione di Dukes modificata**

**Stadio A:** Tumore limitato alla mucosa

**Stadio B1:** Tumore non esteso oltre la muscolare propria

**Stadio B2:** Tumore esteso oltre la muscolare propria, senza coinvolgimento linfonodale

**Stadio C1:** Presenza di metastasi ai linfonodi regionali

**Stadio C2:** Presenza di metastasi ai linfonodi apicali

**Stadio D:** Presenza di metastasi a distanza

Il più recente sistema TNM, raccomandato dall'AJCC (American Joint Committee on Cancer) a partire dal 1950, pone maggiore chiarezza rispetto alla stadiazione di Dukes.<sup>51</sup> 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.

### La staziazione 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:**

Dukes	T	N	M	Stadio	OS a 5 anni
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%

In caso di sospetta neoplasia coloretale è fondamentale iniziare il processo diagnostico con una buona anamnesi in modo da valutare la sintomatologia e la sua durata, la fascia di età e la familiarità per CRC. Segue quindi l'esame obiettivo comprensivo di esplorazione rettale, manovra dotata di una sensibilità variabile dal 44-83%, operatore dipendente, che può consentire la palpazione della lesione se localizzata al retto inferiore, non riuscendo però a differenziare tra patologia infiammatoria e neoplastica. La colonscopia è l'esame strumentale cardine per la conferma diagnostica, caratterizzata da sensibilità e specificità vicine al 100%; questa tecnica ha valenza non solo diagnostica, ma anche terapeutica, potendo essere utilizzata per asportare polipi intestinali di accertata benignità. La procedura è gravata da minimi rischi, quali perforazioni nello 0.1% dei casi, emorragia maggiore nello 0.3%, mortalità dello 0.01-0.03%. La colonscopia completa è fondamentale anche per diagnosticare tumori metacroni presenti del 2-4% dei pazienti.<sup>52</sup> In presenza di lesioni stenosanti che impediscono il passaggio dell'endoscopio, alternative diagnostiche valide sono l'RX con clisma opaco e la colonscopia virtuale. Quest'ultimo esame consiste nell'ottenere immagini tomografiche dopo l'insufflazione del colon con anidride carbonica e la loro ricostruzione in 2D o 3D, con sensibilità simile ad una colonscopia;<sup>53</sup> non permette però di effettuare prelievi biotipici né

asportare lesioni benigne, è caratterizzata da un certo “disconfort” della preparazione pre-esame, dalla necessità di personale altamente specializzato e dalla nocività delle radiazioni. Tutt’ oggi quindi la colonTC viene utilizzata nei centri specializzati come alternativa del clisma opaco o nei casi in cui l’esame endoscopico risulti dubbio, per la presenza di lesioni ostruttive.<sup>54</sup> La rettosigmoidoscopia è invece l’indagine più indicata per la diagnosi di neoplasie del retto; permette l’esplorazione fino a 60cm dal margine anale, indicando quindi la distanza da esso della lesione (informazione fondamentale per programmare un intervento chirurgico); risulta sensibile, specifica e pressochè priva di complicanze.

La conferma istologica nelle neoformazioni del colon dovrebbe essere sempre disponibile prima dell’intervento chirurgico ma può essere omessa, in rari e ben selezionati casi, se le neoformazioni coliche non sono facilmente raggiungibili con l’endoscopia.<sup>55</sup>

Nello studio di un paziente un carcinoma colico è indicato valutare la funzionalità midollare, epatica, renale e il bilancio idro-elettrolitico e i marcatori tumorali, CEA (antigene carcino-embrionario) e CA19.9. La TC torace/addome con mdc è indispensabile per valutare l’estensione loco-regionale e a distanza della malattia; in caso di controindicazioni al mezzo di contrasto endovenoso è possibile richiedere una RM dell’addome con contrasto e una TC torace senza mdc. Una TC pelvica nel carcinoma rettale è fondamentale 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 non permette la valutazione di T e di N ma è indicata prevalentemente nella ricerca di metastasi epatiche, dove in mano ad operatori esperti ha una sensibilità prossima alla TC.

Nel tumore del retto extraperitoneale, per valutare l’estensione locale (T), si utilizzano anche l’ecografia trans-rettale e la RMN della pelvi che permettono di studiare l’infiltrazione della parete colica, del mesoretto, del plesso venoso e del grasso periviscerale.<sup>56</sup> Questi esami ci consentono di individuare i pazienti con infiltrazione del mesoretto ed indirizzarli ad un trattamento neo-adiuvante. Purtroppo ancora oggi molti pazienti con tumore del retto extra-peritoneale non ricevono una stadiazione corretta; la TC della pelvi non definisce in modo ottimale l’estensione loco-regionale della malattia e pazienti con tumore localmente avanzato vengono

erroneamente indirizzati alla chirurgia. Inoltre con le attuali tecniche di imaging non è ancora possibile definire la presenza di carcinomatosi peritoneale. Infine la PET (Positron Emission Tomography) con 18fluoro-2-desossi-D-glucosio, non è strettamente indicata tra gli esami radiologici di stadiazione ma può essere utile per identificare eventuali sedi extraepatiche secondarie di malattia.<sup>57</sup>

## **1.7 Trattamento della malattia localizzata**

### **1.7.1 Cenni di terapia chirurgica**

La chirurgia colon rettale rimane il cardine curativo della terapia del CRC; molta importanza è stata attribuita alla valutazione pre-operatoria e alla stadiazione. 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>58</sup>

L'estensione della resezione è determinata dalla sede, dalla vascolarizzazione e dal drenaggio linfatico della neoplasia, oltre che da un eventuale invasione diretta della neoplasia negli organi adiacenti. È essenziale, inoltre, che le estremità dell'intestino si raffrontino senza tensione e presentino un'adeguata vascolarizzazione.<sup>58</sup> Lo standard chirurgico prevede la rimozione del segmento di colon presentante la lesione con la legatura dei suoi vasi. L'eradicazione del tumore con completa rimozione del drenaggio linfatico, aumenta le possibilità di una resezione curativa (R0). La dissezione linfatica determina l'estensione della resezione colica; generalmente si ricorre ad un'emicolectomia destra (ileo-trasversostomia) con legatura del tronco dell'arteria ileocolica e colica destra per i carcinomi del cieco e colon ascendente; ad una colectomia trasversale con legatura dell'arteria colica media per i carcinomi della parte media del colon trasverso; ad un'emicolectomia sinistra con legatura dell'arteria mesenterica inferiore, per il cancro del discendente e sigma; si opta per una resezione estesa sigma con linfadenectomia centrale e legatura dell'arteria mesenterica inferiore all'arteria colica di sinistra, per il cancro del sigma-colon distale. I carcinomi situati tra due zone di drenaggio (colon trasverso laterale, flessione epatica o milza) sono trattati con emicolectomie estese o colectomia subtotale con dissezione di due aree di drenaggio linfatico. Le resezioni limitate costituiscono deroghe a questi operazioni standard, a cui si ricorre in caso di

malattia metastatica o in situazione di emergenza acuta di perforazione o ostruzione. In presenza di tumori primari multipli o soggetti affetti da HNPCC è indicata la colectomia subtotale, la quale comporta la rimozione del colon, dal cieco sino alla riflessione peritoneale con il confezionamento di un'anastomosi ileo-rettale.<sup>59</sup>

Dal punto di vista pratico l'intervento chirurgico prevede l'asportazione di almeno 10cm di colon a monte e a valle della lesione e del relativo mesentere con almeno 12 linfonodi annessi (numero ottimale da reperire nel pezzo operatorio). La tecnica "no touch" prevede la legatura precoce dei vasi principali prima di qualsiasi manovra sul colon.<sup>60</sup> Tale tecnica è stata messa appunto per la possibilità che durante la manipolazione del tratto di colon interessato dalla neoplasia potessero staccarsi microemboli neoplastici. Studi randomizzati dimostrano che non vi è una sostanziale differenza di sopravvivenza tra gruppi di pazienti trattati con la tecnica "no touch" e quelli trattati con chirurgia convenzionale.

Nel trattamento chirurgico del carcinoma rettale, in particolare quello di tipo extraperitoneale, si pone il problema della conservazione sfinteriale, fondamentale per il mantenimento di una buona qualità della vita. Il carcinoma del retto medio e basso, (cioè extraperitoneale) presenta peculiarità che lo distinguono nettamente dal carcinoma del colon, mentre l'approccio al carcinoma del retto alto (intraperitoneale) non si differenzia da quello della giunzione retto-sigmoideo e del sigma. La chirurgia del carcinoma del retto medio-basso presenta difficoltà tecniche al punto che in alcuni paesi essa viene demandata a centri specialistici.

I cardini di questa chirurgia, al momento attuale, riguardano:

- a) L'escissione totale del mesoretto (TME),
- b) Ove possibile la conservazione della innervazione simpatica e parasimpatica (nerve sparing technique),
- c) Il margine di sezione distale e circonferenziale liberi da neoplasia,
- d) Nelle forme localmente avanzate (T3-T4 e/o con metastasi linfonodali regionali) l'uso delle terapie neoadiuvanti.

### **Escissione totale del mesoretto (total mesorectal excision, TME)**

Il mesoretto è costituito dal tessuto cellulolinfatico che circonda il retto ed è sviluppato posteriormente e lateralmente delimitato dalla fascia propria del retto, separata da un piano avascolare e virtuale dalla fascia presacrale. Questo è lo

spazio che il chirurgo, sotto visione diretta, deve seguire nella dissezione del retto, evitando l'effrazione di entrambe le fasce descritte e dei rami simpatici e parasimpatici, la cui lesione comporta gravi sequele di tipo urinario (vescica neurogena) e sessuale (eiaculazione retrograda, impotenza).<sup>61, 62</sup> Per i carcinomi localizzati oltre i 12 cm dal margine anale, è sufficiente asportare il mesoretto per almeno 5 cm a valle della neoplasia, mentre per i carcinomi del retto extraperitoneale è bene asportare tutto il mesoretto fino al piano degli elevatori.<sup>62</sup>

### **Margine di resezione distale**

Per i carcinomi del terzo inferiore del retto trattati con terapia neoadiuvante e valutati come responsivi è accettabile un margine di 1 cm. Deve essere comunque sempre eseguita una resezione completa del mesoretto. E' utile eseguire un esame istologico intraoperatorio per escludere l'infiltrazione della trancia di sezione distale.<sup>63,64</sup>

### **Margine di resezione circonferenziale (CRM).**

Il CRM indica il margine di tessuto sano compreso fra qualsiasi struttura neoplastica (tumore primitivo o linfonodo) presente nel mesoretto ed il margine di resezione mesorettale stesso.

La presenza di neoplasia entro 1 mm dal CRM è correlata non solo ad una alta probabilità di recidiva locale, ma anche ad una minor sopravvivenza globale e libera da malattia e la resezione è da ritenersi non radicale se la fascia propria del retto non è integra.<sup>65</sup>

### **Trattamento chirurgico per i carcinomi del retto extraperitoneale.**

Gli interventi chirurgici per il carcinoma del retto medio-basso sono:

- **Resezione anteriore:** il retto viene asportato fino al di sotto del polo caudale della neoplasia con tutto il mesoretto e la continuità digestiva ripristinata mediante una anastomosi colo-rettale in genere eseguita con una suturatrice meccanica.
- **Resezione del retto con colo-ano anastomosi:** il retto viene asportato completamente con tutto il mesoretto. La continuità digestiva viene ripristinata mediante una anastomosi colo-anale, manuale. Per entrambi gli interventi precedenti la ricostruzione della continuità digestiva può essere diretta oppure prevedere il confezionamento di una neoampolla a J (detta anche J-pouch) utilizzando il colon

prossimale. La costruzione di una neoampolla, si correla con un beneficio funzionale nei primi 12-18 mesi postoperatori.

- **Resezione di retto per via addomino-perineale (intervento di Miles):** vengono asportati in blocco per via combinata addominale e perineale il retto con il mesoretto, canale anale ed ano, ed eseguita una con colostomia definitiva. Le indicazioni a questo intervento sono oggi limitate alle neoplasie che infiltrano il canale anale e l'apparato sfinterico.

- **Escissione locale:** si può effettuare tramite un'escissione transanale o attraverso un approccio endoscopico microchirurgico (es. transanal endoscopic microsurgery, TEM).<sup>34</sup>

Grazie all'introduzione della TME, la sopravvivenza a 5 anni è passata dal 45-50% al 75%, i tassi di recidiva locale sono diminuiti dal 30% al 5-8%, la conservazione dello sfintere è aumentata di almeno il 20% per il medio e basso tumori rettali, e i tassi di impotenza e disfunzione della vescica sono diminuiti 50-85% al 15%. I pazienti con tumore del retto possono avere oggi una buona prognosi e qualità della vita.<sup>66</sup>

### 1.7.2 Cenni di chemioterapia adiuvante

L'indicazione alla terapia adiuvante varia in base allo stadio clinico della malattia. Nello stadio I ( T1S, T1-T2 N0) non vi è indicazione al trattamento medico in seguito alla rimozione chirurgica della lesione. Questo gruppo di pazienti viene sottoposto al solo follow-up.

Nello stadio II si dividono due gruppi: pazienti privi di fattori di rischio (T3 N0 M0) in cui si può optare per il solo follow-up e pazienti con fattori di rischio (T4 N0 M0, <12 linfonodi asportati all'intervento, G3, invasione linfatica e/o vascolare o storia di occlusione e/o perforazione intestinale) per cui vi è indicazione al trattamento adiuvante con fluoropirimidine e oxaliplatino. Nel tumore del retto T3 vi è, in linea di massima, sempre indicazione ad un trattamento adiuvante o meglio di chemioradioterapia pre-operatoria seguite eventualmente da un trattamento chemioterapico post-operatorio.

I pazienti in stadio III sono candidati a ricevere chemioterapia adiuvante, che ha dimostrato una riduzione del rischio relativo di morte del 33%, con un beneficio assoluto in sopravvivenza del 10-15%.<sup>34, 67</sup>

Per più di quarant'anni il 5-fluorouracile (5FU) è stato l'unico farmaco a disposizione per il trattamento dei tumori gastroenterici ed in particolare per il trattamento del CRC; nonostante l'introduzione di altri farmaci citotossici, tale molecola è, tutt'oggi, al centro dei vari schemi di trattamento dei tumori colorettali.

I primi studi che hanno dimostrato l'efficacia della chemioterapia adiuvante, negli anni '90, furono effettuati dal National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) e dal North Central Cancer Treatment Group (NCCTG); lo studio NSABP C-01 prevedeva la randomizzazione di 1166 pazienti in stadio B e C secondo Dukes in 3 bracci: osservazione esclusiva, terapia con 5FU, semustina e vincristina, oppure trattamento con bacillo di Calmette e Guérain (BCG); per la prima volta venne dimostrato un incremento della disease free survival (DFS) ( $p=0.02$ ) e della sopravvivenza globale (OS) ( $p=0.05$ ) nel braccio che aveva ricevuto chemioterapia adiuvante dopo resezione curativa.<sup>68</sup> Il trial della NCCTG randomizzava invece pazienti con CRC in stadio III a ricevere osservazione, acido folinico (AF), oppure AF e 5FU. In questo trial il regime di combinazione ha dato luogo a una riduzione del 40% del rischio di recidiva ( $p<0.0001$ ) e del 33% della mortalità ( $p=0.0007$ ) dimostrando quindi di essere una chemioterapia adiuvante efficace e ben tollerata dai pazienti con CRC ad alto rischio di recidiva.<sup>69</sup>

L'attività del 5FU può essere potenziata tramite modulazione biochimica e l'infusione continua (per 48 h), ma la strategia più efficace risulta la combinazione con AF. Lo studio IMPACT ha valutato l'efficacia della terapia adiuvante con 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), dimostrando una riduzione delle recidive del 35% ( $p=0.0001$ ) e della mortalità del 22% ( $p=0.0029$ ); 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. Confrontando diversi schemi di somministrazione, come il Mayo Clinic e il Roswell Park regimen, caratterizzato da 500 mg/m<sup>2</sup> di 5FU e 500 mg/m<sup>2</sup> di AF settimanale × 6 settimane, ogni 8 settimane per 4 cicli, è emersa una diversa distribuzione degli effetti collaterali; in particolare nel primo caso prevalgono la neutropenia e la stomatite, mentre nel secondo la diarrea.<sup>70</sup> Un ulteriore studio ha comparato l'infusione continua di 5FU con il classico trattamento adiuvante e.v. (5FU/LV), dimostrando equiattività del trattamento infusione e una minore tossicità ematologica e gastrointestinale a prezzo di

maggior tasso di episodi tromboembolici a livello del catetere venoso centrale e di sindrome mano piede, un rash eritematoso localizzato ai palmi delle mani e dei piedi. Il 5FU ha una breve emivita quindi l'utilizzo del farmaco in infusione servirebbe a reclutare un maggior numero di cellule in fase S, la fase più suscettibile al trattamento; inoltre consente di aumentare l'intensità di dose senza avere incrementi della tossicità.<sup>70</sup> L'attuale schema "ibrido" più impiegato prevede una combinazione di AF, 5FU in bolo e 5FU in infusione da somministrarsi in 48 ore ogni 15 giorni.

Il gruppo Adjuvant Colon Cancer Endpoints ha valutato l'efficacia della terapia adiuvante con 5FU in pazienti con CRC in stadio 2 e 3 tramite un'analisi sui dati dei singoli pazienti (più di 20.800) trattati nell'ambito di 18 studi sulla terapia adiuvante. E' stato dimostrato un significativo beneficio della terapia adiuvante in termini di OS negli 8 anni di follow-up., i tassi di recidiva si riducevano all'aumentare del tempo trascorso dall'intervento: in particolare dopo 5 e 8 anni sono stati osservati dei tassi di recidiva di inferiori al 1.5% a allo 0.5% rispettivamente. Nei pazienti in stadio 3 il tasso di OS a 8 anni risultavano del 42,7% nei pazienti trattati con la sola chirurgia e 53% nei pazienti sottoposti a terapia adiuvante con 5FU ( $p < 0.0001$ ); i tassi di OS incrementavano anche nei pazienti in stadio 2 risultando del 66.8% e del 72.2% rispettivamente ( $p = 0.026$ ).

Negli ultimi anni innovazioni in ambito della terapia adiuvante sono state apportate dall'aggiunta dell'oxaliplatino e dalla possibilità di sostituire il 5FU con una fluoropirimidina orale (capecitabina).<sup>71</sup>

La capecitabina (o xeloda) è un profarmaco del 5FU a somministrazione orale, assorbito dalla mucosa intestinale ed attivazione selettiva a livello intratumorale. Tale farmaco è stato valutato in uno studio di terapia adiuvante che ha randomizzato 1987 pazienti con CRC resecato in III stadio a ricevere capecitabina o 5FU/LV (secondo lo schema Mayo clinic) per 24 settimane. I risultati hanno dimostrato come i pazienti trattati con capecitabina presentavano una DFS pari a quella dei pazienti trattati con 5FU ( $p < 0.001$ ) e una migliore RFS (relapse free survival) ( $HR = 0.86$  95%CI 0.74-0.99  $p = 0.049$ ); i pazienti trattati con capecitabina presentavano una minor incidenza di stomatite e neutropenia, ma una più frequente insorgenza di iperbilirubinemia e sindrome mano-piede.<sup>72</sup>

Riguardo al ruolo dell' oxaliplatino due sono i principali trial che ne hanno determinato

l'efficacia nel trattamento adiuvante. Lo studio multicentrico di fase 3 MOSAIC (Multicenter International study of oxliplatinum/5 fluorouracile/leucovorin in adjuvant treatment of colon cancer) ha randomizzato 2246 pazienti in stadio II e III a ricevere 5FU/LV o FOLFOX per 6mesi.

L'obiettivo primario era la DFS che a 5 anni è risultata del 73.3% nei pazienti trattati con oxaliplatino e del 67.4% nel braccio con 5FU/LV (HR=0.80 95%CI 0.68-0.93 p=0.003). Il tasso di OS a 6 anni è risultato del 78.5% e del 76.0% nei due gruppi rispettivamente (HR=0.84 95%CI 0.71-1.00 p=0.046). Tale vantaggio non è stato osservato nell'analisi di sottogruppo che ha valutato i pazienti in stadio 2. In termini di OS, non sono state dimostrate differenze significative a 6 anni tra i due gruppi (HR=0.84 95%CI 0.71-1.00 p=0.046). Un analisi di sottogruppo ha però dimostrato un vantaggio significativo nei pazienti trattati con oxaliplatino in stadio III.<sup>73</sup> Nel gruppo trattato con FOLFOX è stato osservato un tasso significativamente maggiore di neutropenia, vomito, diarrea di grado 3 e 4; la neutropenia febbrile ha complicato il quadro clinico rispettivamente nell'1.8% e 0.2% dei pazienti. Una neuropatia periferica severa si è verificata nel 12% dei pazienti trattati con oxaliplatino durante il trattamento, tuttavia dopo 48 mesi di osservazione persisteva nello 0.7% dei casi.<sup>74</sup>

Dati analoghi sono stati osservati dallo studio NSABP C-07 nel quale sono stati randomizzati 2407 pazienti CRC in stadio II e III a ricevere terapia adiuvante con 5FU/LV secondo lo schema Roswell Park (85 mg/m<sup>2</sup> alla 1, 3 e 5 settimana di ogni ciclo da 8 settimane) in associazione o meno a oxaliplatino. Nel gruppo trattato con FOLFOX rispetto al quello trattato con 5FU è emersa una riduzione del rischio di progressione di malattia pari al 20% (HR=0.80 95%CI 0.69-0.93 p=0.03). La DFS a 3 e 4 anni è stata 71.8% e 67% nel braccio 5FU/LV e 76% e 73.2% nel braccio FOLFOX.<sup>75</sup>

I dati dello studio XELOXA confermano un beneficio in DFS anche per la combinazione tra capecitabina ed oxaliplatino, beneficio che appare sovrapponibile a quello ottenuto con le combinazioni endovenose. Per tale combinazione non vi è ancora dimostrazione di un beneficio in sopravvivenza.<sup>76</sup>

Nella pratica clinica tutti i pazienti che devono effettuare 5FU o capecitabina sono sottoposti all'analisi mutazionale dell'enzima diidropirimidina deidrogenasi (DPD) principale responsabile del metabolismo delle fluoropirimidine. In particolare, in

numerosi studi le varianti c.IVS14+1G>A e c.2846A>T della DPD sono state associate a tossicità di grado severo in pazienti trattati con fluoropirimidine; la mutazione dell'enzima presenta un'incidenza di 1 caso su 3000 pazienti e costituisce un criterio di esclusione per il trattamento con fluoropirimidine.<sup>77 78</sup>

Il trattamento con fluoropirimidine in monochemioterapia, sia per via orale (capecitabina) che endovenosa, può essere ancora considerato una valida alternativa in caso di malattia a migliore prognosi (IIIa), soprattutto nei pazienti con ridotto performance status. In considerazione della negatività di 3 studi randomizzati, in cui non si è evidenziato nessun vantaggio in DFS e OS a fronte di un aumento della tossicità, le combinazioni contenenti irinotecano non devono essere impiegate nella pratica clinica.<sup>79 80</sup>

Gli studi di terapia adiuvante con farmaci biologici fino ad ora disponibili hanno escluso l'utilità di tali farmaci nel trattamento adiuvante del carcinoma del colon. In particolare lo studio AVANT sembra anzi mostrare un effetto sfavorevole in OS della combinazione FOLFOX + bevacizumab.<sup>81, 82</sup> Anche i dati con cetuximab sembrano suggerire un effetto detrimentalmente, presente nei pazienti *KRAS* mutati ma anche, seppure in misura non statisticamente significativa, nei pazienti *KRAS* wild-type.<sup>83</sup>

La chemioterapia deve essere iniziata preferenzialmente entro 6-8 settimane dall'intervento chirurgico. Inizi più tardivi riducono il potenziale beneficio. In casi ad elevato rischio, in cui per complicazioni post-chirurgiche si sia superato tale tempistica, il trattamento deve comunque essere considerato discutendo con il paziente rischi e benefici.<sup>84</sup>

Al di fuori di studi clinici la durata ottimale del trattamento adiuvante è attualmente di 6 mesi.<sup>73</sup>

## Capitolo 2. Trattamento della malattia metastatica

I pazienti con malattia metastatica (stadio IV) costituiscono il 20% delle diagnosi di carcinoma coloretale e circa il 35% dei pazienti trattati con intento curativo svilupperà la malattia avanzata. Nella maggior parte dei pazienti a questo stadio di malattia l'obiettivo terapeutico è la palliazione, ma in alcuni casi selezionati è possibile perseguire la guarigione. Oggi le strategie per il trattamento dei pazienti con carcinoma coloretale metastatico (mCRC) comprendono in primo luogo la chemioterapia sistemica, ma possono contribuire anche la radioterapia e la chirurgia. Oltre a questa macrosuddivisione clinica, attualmente il trattamento della malattia avanzata deve tenere in considerazione le diverse caratteristiche molecolari dei tumori colorettali, che possono fornire indicazioni predittive e prognostiche utili per impostare la terapia più appropriata per ogni singolo paziente.

I farmaci a disposizione sono le fluoropirimidine sia orali che endovenose, l'oxaliplatino, l'irinotecano, gli anticorpi monoclonali anti-EGFR e gli antiangiogenici.

### 2.1 I farmaci citotossici: 5-fluorouracile, oxaliplatino, irinotecano

I farmaci citotossici sono il cardine del trattamento dei pazienti affetti da mCRC. Per molti anni l'unico farmaco disponibile per il trattamento di questa patologia è stato il 5FU in monoterapia. I pazienti trattati con tale regime ottenevano una sopravvivenza mediana intorno ai 6 mesi.<sup>85</sup> Successivamente il panorama dei farmaci citotossici si è ampliato con l'introduzione di irinotecano e oxaliplatino, studiati prima in associazione al 5FU (doppiette)<sup>86, 87</sup> e successivamente utilizzati in maniera concomitante (FOLFOXIRI).<sup>88</sup> Inoltre più recentemente alcuni trials hanno valutato il ruolo della capecitabina da sola o in associazione con gli altri citotossici e tale farmaco ha trovato uno spazio nel trattamento della malattia metastatica.<sup>89</sup>

L'efficacia della combinazione di 5FU e irinotecano in prima linea è stata valutata in uno studio multicentrico che ha comparato in 683 pazienti FOLFIRI versus 5FU/LV o irinotecano in monoterapia. Gli obiettivi primari erano la PFS e la OS. I pazienti trattati con FOLFIRI hanno ottenuto un vantaggio significativo in termini di PFS

mediana (7.0 vs. 4.3 mesi, HR=0.64 p=0.004) e di OS mediana (14.8 vs 12.6 mesi, HR=0.78 p=0.04) rispetto ai pazienti trattati con solo 5FU. Mentre non sono state dimostrate differenze significative tra i pazienti trattati con 5FU e con irinotecano. In termini di tossicità, il regime di combinazione incrementava gli episodi di diarrea di grado 3, tuttavia il tasso di episodi di grado 4 era < 8% in entrambi i bracci.<sup>86</sup> A sostegno di questi risultati, un ulteriore studio ha dimostrato l'efficacia della doppietta con FOLFIRI nel trattamento della malattia coloretale avanzata. 387 pazienti non precedentemente trattati con chemioterapia, sono stati randomizzati a ricevere FOLFIRI (n=199) o 5FU/LV (n=188). Gli obiettivi primari erano la RR e la PFS. Il gruppo trattato con FOLFIRI ha mostrato un incremento significativo della RR (49% vs 31%, p<0.001 nei pazienti valutabili) e della PFS mediana (6.7 vs 4.4 mesi p<0.001) rispetto a quelli trattati nel braccio di controllo. Le tossicità di grado 3 e 4 erano significativamente più frequenti nel gruppo con irinotecano ma risultavano reversibili, non cumulative e facilmente gestibili dal punto di vista clinico.<sup>90</sup> Negli stessi anni uno studio multicentrico di fase III ha valutato l'efficacia in termini di RR della combinazione FOLFOX nel trattamento dei pazienti con malattia avanzata. I 200 pazienti arruolati sono stati randomizzati a ricevere 5FU/LV o FOLFOX. La RR (endpoint primario) si attestava al 16% e al 53%, mentre la PFS raggiungeva 6.1 mesi e 8.7 mesi rispettivamente nei due bracci. Nel braccio della doppietta in circa il 43% dei pazienti è stata riscontrata diarrea di grado 3 e/o 4 e circa il 13% ha avuto neuropatia periferica di grado 2.<sup>87</sup> In conclusione tali studi hanno dimostrato che l'associazione di 5FU/LV con irinotecano o con oxaliplatino migliorava in modo significativo la sopravvivenza e la PFS dei pazienti mCRC a prezzo di un profilo di tossicità estremamente maneggevole, pertanto la FDA ha registrato tali farmaci rispettivamente nel 2000 e nel 2003.

Successivamente in uno studio di fase III il GOIM (Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale) ha valutato l'efficacia della terapia in prima linea con regime FOLFIRI (braccio A) vs FOLFOX4 (braccio B) in 360 pazienti con carcinoma coloretale metastatico; la ORR era del 31% vs 34%, il tempo medio alla progressione di 7 mesi vs 7mesi e la OS mediana di 14 vs 15 mesi per il braccio A vs il braccio B, rispettivamente. Le tossicità risultavano di grado moderato in entrambi i gruppi; alopecia e disturbi gastrointestinali erano più frequenti nel braccio A, mentre trombocitopenia e neuropatia periferica nel braccio B. Questi dati dimostravano una

sostanziale equivalenza nell'efficacia tra i due schemi di trattamento in prima linea; le uniche differenze riguardavano il profilo di tossicità.<sup>91</sup> Analogamente il GERCOR trial che ha confrontato una strategia terapeutica che prevedeva FOLFIRI seguita da FOLFOX6 (braccio A), con lo schema inverso FOLFOX6 seguito da FOLFIRI (braccio B), in 220 pazienti con mCRC. Non sono state evidenziate differenze in termini di sopravvivenza (mOS=21.5 braccio A vs 20.6 mesi braccio B (p=0.99)) né di PFS (mPFS=14.2 braccio A vs 10.9 mesi braccio B (p=0.64)).<sup>92</sup> Sulla base di questi studi è possibile affermare che i due regimi sono equivalenti in termini di efficacia, mentre hanno un profilo di tossicità peculiare, per cui la scelta della doppietta deve essere effettuata sulla base delle caratteristiche e delle preferenze del paziente. In particolare è preferibile scegliere FOLFIRI nei pazienti precedentemente sottoposti a terapia adiuvante a base di oxaliplatino o se esiste un elevato rischio di neuropatia periferica. Mentre la scelta cadrà sul regimeXELOX nei pazienti in cui non è indicato/preferito il posizionamento di un catetere venoso centrale o se si preferisce ridurre gli accessi in day hospital. Infine FOLFOX e XELOX sono da preferire nei pazienti con alterazione della funzionalità epatica, nei pazienti affetti da sindrome di Gilbert e nei soggetti ad alto rischio di diarrea e disidratazione come coloro sottoposti a colectomia totale.

Nell'ambito di un trial di fase III anche la capecitabina ha dimostrato efficacia e sicurezza equiparabili al trattamento con 5FU/LV nel mCRC, 602 pazienti sono stati randomizzati a ricevere capecitabina o 5FU/LV fino alla progressione o alla comparsa di tossicità inaccettabili. La ORR è stata di 18.9% per la capecitabina e di 15% per il 5FU/LV; mentre il tempo medio alla progressione è stato di 4.2 vs 4.0 mesi (p=0.89) e l'OS mediana di 13.2 e 12.1 mesi (p=0.33). Il profilo di tossicità in entrambi i bracci corrispondeva a quello caratteristico delle fluoropirimidine.<sup>89</sup> In seguito, l'associazione XELOX (xeloda + oxaliplatino) versus FOLFOX è stata valutata in vari trials e una metanalisi di sei studi di fase II e III ha evidenziato che il trattamento con fluoropirimidine orali ha una efficacia minore in termini di RR (OR=0.85 95%CI 0.74-0.97 p=0.02), mentre la PFS e la OS non presentano differenze significative. I dati giustificano quindi l'utilizzo dello schema XELOX in questo setting.<sup>93</sup>

L'associazione di capecitabina e irinotecano è stata inizialmente valutata in uno studio di non inferiorità in cui venivano comparate le schedule XELIRI e FOLFIRI. Tuttavia si sono verificati 8 decessi precoci non correlati alla progressione di malattia che hanno determinato la chiusura dello studio.<sup>94</sup> Successivamente, un ulteriore studio di fase III ha valutato l'efficacia e la sicurezza di capelRI in confronto con FOLFIRI o IFL. Non sono state registrate differenze significative in termini di efficacia (mPFS=7.6 mesi per FOLFIRI, 5.9 mesi per mIFL (p=0.004); 5.8 mesi per CapelRI (p=0.015); mOS=23.1 mesi per FOLFIRI, 17.6 mesi per mIFL (p=0.09); 18.9 mesi per CapelRI (p=0.27)) mentre è stato osservato che il trattamento con CapelRI era associato ad una maggiore incidenza di vomito, diarrea e disidratazione; pertanto questo schema non trova indicazione nel trattamento in prima linea.<sup>95</sup>

Sulla base dell'osservazione emersa da una analisi pooled che ha dimostrato che l'esposizione a tutti e tre i farmaci citotossici determina un beneficio in termini di OS<sup>96</sup> e che sulla base di promettenti studi preclinici<sup>98</sup> che hanno mostrato una potenziale attività sinergica dei tre citotossici Falcone et al hanno condotto studi di fase I e II per valutare l'attività e il profilo di sicurezza della combinazione di 5FU, irinotecano e oxaliplatino (FOLFOXIRI) nei pazienti con mCRC.<sup>99,100,101</sup> Le tossicità più rilevanti, diarrea (grado 3 21%) e neutropenia (grado 4 55%), risultavano clinicamente accettabili. Il regime si è mostrato molto attivo (RR 71.4%), inoltre il 26% dei pazienti sono stati sottoposti a resezione della malattia secondaria. La PFS e la OS erano rispettivamente di 10.4 e di 26.5 mesi. Tale studio dimostrava la tollerabilità e la maneggevolezza dello schema FOLFOXIRI in prima linea, evidenziando l'assenza di particolari interazioni farmacocinetiche tra i tre farmaci.<sup>88</sup> Sulla base di questi promettenti risultati il GONO (Gruppo Oncologico del Nord-Ovest) e il Gruppo di Ricerca Oncologica Ellenica hanno disegnato ciascuno uno studio randomizzato di fase III per comparare il trattamento in prima linea con FOLFIRI vs FOLFOXIRI. Lo studio condotto dal GONO ha coinvolto 244 pazienti con malattia metastatica non resecabile e ha ottenuto un tasso di risposte (obiettivo primario) del 34% nel braccio FOLFIRI rispetto al 60% nel braccio FOLFOXIRI (p<0.0001). La PFS è stata di 6.9 vs 9.8 mesi, (HR=0.63 95%CI 0.47-0.81 p=0.0006) e la OS di 16.7 mesi vs 22.6mesi (HR=0.70 95%CI 0.50-0.96 p=0.032) a favore del trattamento con FOLFOXIRI. Nei pazienti trattati con tripletta è stata registrata una percentuale maggiore di neurotossicità periferica di grado 2 o 3 (0% vs 19% p<0.001) e di neutropenia (28%

vs 50%). L'incidenza di neutropenia febbrile (3% vs 5%) e di diarrea di grado 3 o 4 (12% vs 20%) non variava significativamente nei due bracci. Il tasso di resezione secondaria R0 era maggiore nel braccio sperimentale sia nella popolazione generale (6% vs 15%  $p=0.033$ ) che nei pazienti con sole metastasi epatiche (12% vs 36%  $p=0.017$ ). In conclusione sulla base di questi risultati possiamo affermare che FOLFOXIRI in prima linea incrementa la RR, la PFS, e la OS rispetto al FOLFIRI, causando un lieve e maneggevole incremento delle tossicità.<sup>102</sup> Al contrario lo studio del gruppo HORG non ha dimostrato un vantaggio nell'utilizzo della tripletta, tuttavia vari elementi permettono di spiegare questi risultati differenti: la scheda prevedeva la somministrazione di 5FU in bolo, dosi ridotte di oxaliplatino e irinotecano e la popolazione di pazienti arruolata comprendeva anziani e soggetti con condizioni generali compromesse.<sup>103</sup>

## **2.2 I farmaci biologici**

Negli ultimi anni le crescenti conoscenze nell'ambito dei meccanismi biomolecolari alla base della trasformazione e progressione tumorale hanno permesso di mettere a punto farmaci a bersaglio molecolare. Nel trattamento del mCRC attualmente due principali classi di farmaci a bersaglio molecolare vengono utilizzate: si tratta di farmaci antiangiogenetici, bevacizumab e aflibercept e farmaci anti-epidermal growth factor receptor (EGFR), cetuximab e panitumumab. Tali farmaci in associazione ai citotossici precedentemente descritti hanno contribuito a migliorare significativamente la prognosi dei pazienti affetti da mCRC.<sup>104-107</sup> Recentemente regorafenib un inibitore tirosinchinasico multitarget è stato registrato per il trattamento in seconda linea e per linee successive.<sup>108</sup>

La storia della terapia a bersaglio molecolare inizia con gli studi sull'efficacia del bevacizumab condotti inizialmente in prima linea e seconda linea. Successivamente è stato dimostrato che proseguire bevacizumab oltre la progressione alla prima linea di trattamento determinava un ulteriore incremento della sopravvivenza mediana.<sup>109</sup>

Al contrario gli anti-EGFR sono stati studiati dapprima in linee avanzate e successivamente è stata dimostrata la loro efficacia anche in prima linea.<sup>110</sup> Tuttavia l'impiego dei farmaci anti EGFR è stato ottimizzato dopo la determinazione del ruolo

predittivo dello stato mutazionale di dell'esone 2 di *KRAS*: i pazienti portatori di una mutazione di questo gene sono risultati in analisi retrospettive e post-hoc di studi randomizzati resistenti al trattamento; successivamente altre mutazioni rare di *KRAS* (esoni 3 e 4) e le mutazioni di di *NRAS* (esoni 2, 3 e 4) sono state identificate come fattori predittivi negativi al trattamento con anti-EGFR e l'ulteriore selezione molecolare ha incrementato il beneficio clinico ottenuto con questi farmaci in pazienti selezionati dal punto di vista molecolare.

### **2.2.1 Farmaci anti-angiogenetici**

L'angiogenesi è un processo multifasico che determina la formazione di nuovi vasi sanguigni a partire dal letto vascolare preesistente. Nell'ambito dello sviluppo tumorale l'acquisizione dell'attività angiogenetica permette l'apporto di ossigeno e nutrienti al tumore, favorendo la crescita, lo sviluppo e la migrazione delle cellule tumorali. Considerata l'importanza della vascolarizzazione nella carcinogenesi gli studi traslazionali hanno cercato di individuare farmaci in grado di bloccare questo processo.<sup>111</sup> Tra i fattori proangiogenetici spiccano le proteine della famiglia VEGF, ed in particolare la prima proteina scoperta il VEGF-A, fattore solubile, che tramite l'interazione con il proprio recettore VEGFR-2 localizzato sulle cellule endoteliali, promuove la crescita di nuovi vasi sanguigni. I farmaci antiangiogenetici sono stati disegnati per bloccare il modo specifico la via VEGF/VEGF-R2.<sup>112</sup> Bevacizumab è un anticorpo monoclonale ricombinante umanizzato capace di inibire tutte le isoforme di VEGF-A sequestrando tale fattore solubile dal circolo, mediante la formazione di aggregati bevacizumab/VEGF-A.<sup>113</sup> Oltre ai classici effetti antiangiogenetici bevacizumab, riducendo la pressione interstiziale a livello del tumore permette una migliore diffusione della chemioterapia nelle sedi bersaglio.<sup>114, 115</sup> In uno studio randomizzato di fase III è stata valutata l'associazione di bevacizumab ad una chemioterapia di prima linea a base di irinotecano e 5FU (schema IFL), in 813 pazienti con mCRC. L'aggiunta di bevacizumab alla chemioterapia ha determinato un incremento in termini di OS mediana obiettivo primario dello studio (20.3 vs 15.6 mesi HR=0.66 p<0.001), in termini di RR (44.8% vs 34.8% p=0.004) e di PFS mediana (10.6 mesi vs 6.2 mesi HR= 0.64 p<0.001 nei due bracci rispettivamente). Il regime di associazione non incrementava in maniera significative le tossicità chemio-correlate. Tuttavia bevacizumab presentava un profilo di tossicità peculiare

caratterizzato da ipertensione, proteinuria, sanguinamento, aumento dell'incidenza di episodi tromboembolia venosa o arteriosa, perforazioni gastrointestinali e ritardo nella riparazione delle ferite.<sup>116</sup> Sulla base di questi risultati promettenti bevacizumab nel 2004 è stato registrato dall'FDA per il trattamento nel mCRC in associazione alla chemioterapia.<sup>104</sup>

Un ulteriore studio di fase III ha testato l'efficacia e la sicurezza di bevacizumab in associazione a FOLFOX e XELOX in prima linea in 1401 pazienti con mCRC. La PFS mediana obiettivo primario dello studio era di 9.4 mesi nel braccio bevacizumab e 8.0 mesi nel braccio placebo (HR=0.83 97.5%CI 0.72-0.95 p=0.0023). L'OS mediana era 21.3 mesi nel gruppo bevacizumab vs 19.9 mesi nel gruppo placebo (HR=0.89 97.5%CI 0.76-1.03 p=0.077). I tassi di risposta erano simili in entrambi i bracci dello studio. Questi risultati devono essere interpretati alla luce di alcune considerazioni. Infatti nonostante il protocollo raccomandasse di proseguire l'anticorpo fino alla progressione, la maggior parte dei pazienti ha sospeso il bevacizumab dopo 6 mesi. Nel gruppo di pazienti che ha proseguito bevacizumab fino a progressione è stato riscontrato un ulteriore guadagno in PFS, rispetto a chi ha sospeso precocemente la terapia.<sup>117</sup> Bevacizumab è efficace anche nella terapia di prima linea con fluoropirimidine in monoterapia, in pazienti non candidati all'uso di doppiette. Nello studio condotto da Kabbinavar e coll 209 pazienti mCRC sono stati randomizzati a ricevere 5FU +/- bevacizumab in prima linea di trattamento. L'obiettivo primario dello studio era l'OS. La sopravvivenza mediana è stata di 16.6 mesi per il gruppo FU + bevacizumab e 12.9 mesi per il gruppo FU + placebo (HR=0.79 p=0.16). La PFS mediana ha raggiunto i 9.2 mesi (FU + bevacizumab) vs 5.5 mesi (FU + placebo) (HR=0.50 p=0.0002). La RR era del 26.0% (FU + bevacizumab) e del 15.2% (FU + placebo) (p=0.055).<sup>118</sup> Successivamente uno studio di fase III ha dimostrato l'efficacia dell'associazione di bevacizumab e capecitabina in pazienti anziani o non candidati al trattamento con doppietta. L'età media dei 280 pazienti randomizzati era di 76 anni. L'aggiunta di bevacizumab incrementava la PFS, obiettivo primario dello studio (9.1 vs 5.1 mesi HR=0.53 95%CI 0.41-0.69 p<0.0001) e il RR (19% vs 10% p=0.04).<sup>119</sup> Tornando ai regimi di combinazione, la sicurezza e l'attività di bevacizumab sono state valutate in associazione a FOLFOXIRI dapprima in uno studio di fase II condotto dal gruppo GONO (FOIB). 57 pazienti con mCRC non resecabile sono stati sottoposti ad FOLFOXIRI + bevacizumab per un periodo

massimo di sei mesi e in seguito trattati con mantenimento con il solo anticorpo. Lo studio ha riportato promettenti risultati in termini di RR (77%) e di controllo della malattia (100%). I principali effetti collaterali di grado 3-4 sono stati neutropenia (49%) e diarrea (14%), e il profilo di sicurezza era paragonabile a quello ottenuto con il solo FOLFOXIRI confermando che le tossicità relative alla chemioterapia non erano incrementate dall'aggiunta dell'anticorpo.<sup>120</sup>

Sulla base di questi risultati è stato disegnato lo studio di fase III TRIBE. 508 pazienti con malattia metastatica non resecabile sono stati randomizzati a ricevere FOLFOXIRI + bevacizumab vs FOLFIRI + bevacizumab. Lo schema prevedeva 12 cicli di induzione e a seguire 5FU + bevacizumab di mantenimento fino alla progressione. L'obiettivo primario è stato raggiunto: nella coorte di pazienti trattati con la tripletta la PFS era di 12.1 mesi rispetto ai 9.7 mesi nel braccio FOLFIRI + bevacizumab (HR=0.75 95%CI 0.62-0.90 p=0.003). Anche la RR, calcolata secondo i criteri RECIST, risultava significativamente aumentata (65% vs 53% HR=1.64 95%CI 1.15-2.35 p=0.006). Inoltre ad un follow up mediano di 48.1 mesi si registrava un vantaggio significativo in OS 29.8 vs 25.8 mesi (HR=0.80 95%CI 0.65-0.98 p=0.030). Il tasso di sopravvivenza a 5 anni era doppio nel braccio FOLFOXIRI + bevacizumab e (24.9% vs 12.4%) ciò sottolineava l'efficacia di tale schema anche nella sopravvivenza a lungo termine. L'intensificazione del trattamento era associata a un aumento dell'incidenza di neurotossicità di grado 3 o 4, stomatite, diarrea e neutropenia, mentre non variavano in modo significativo la neutropenia febbrile, gli effetti collaterali di grado 4, né i decessi correlati al trattamento.<sup>121</sup>

L'efficacia del bevacizumab in linee successive alla prima è stata testata nello studio ECOG 3200. Un gruppo di 829 pazienti mCRC precedentemente trattati con FOLFIRI sono stati randomizzati a ricevere FOLFOX + bevacizumab, FOLFOX o solo bevacizumab. La PFS media è stata 7.3 mesi, 4.7 mesi e 2.7 mesi rispettivamente nei tre bracci (HR=0.61 p<0.0001). Le ORR corrispondenti erano 22.7%, 8.6% e 3.3% dimostrando che l'aggiunta di bevacizumab comportava un beneficio anche nelle linee successive alla prima.<sup>122</sup> Nello studio di fase III TML è stata valutata l'efficacia dell'aggiunta di bevacizumab alla chemioterapia di seconda linea in 820 pazienti con mCRC precedentemente trattati con chemioterapia e bevacizumab. L'OS mediana (obiettivo primario dello studio) è stata di 11.2 vs 9.8 mesi nel gruppo trattato con chemioterapia e bevacizumab rispetto al gruppo trattato

con la sola chemioterapia (HR=0.81 95%CI 0.69-0.94 p=0.006). Tale studio ha dimostrato che la prosecuzione di bevacizumab oltre la progressione di malattia è un'opzione percorribile e vantaggiosa.<sup>123</sup> Un trial simile è stato condotto anche dal GONO, lo studio di fase III BEBYP ha infatti valutato l'efficacia della prosecuzione o della reintroduzione di bevacizumab in combinazione alla chemioterapia di seconda linea nei pazienti precedentemente trattati e progrediti dopo un trattamento con bevacizumab e chemioterapia.. Questo trial è stato interrotto prematuramente dopo la presentazione dei risultati dello studio TML, appena citato. I 185 pazienti, randomizzati sono stati trattati sottoposti ad una chemioterapia di seconda linea (FOLFOX o FOLFIRI) in associazione o meno a bevacizumab. L'obiettivo primario dello studio era la PFS, risultata di 6.8 mesi nei pazienti trattati con chemioterapia e bevacizumab e 5.0 mesi nel braccio di controllo (HR=0.70 95%CI 0.52-0.95 p=0.010). Le analisi di sottogruppo hanno mostrato un sostanziale beneficio dalla prosecuzione in seconda linea di bevacizumab in ogni categoria esaminata. Nel braccio sperimentale è stato registrato anche un incremento della OS (HR=0.77 95%CI 0.56-1.06 p=0.043). In conclusione anche questo studio supporta l'utilizzo di bevacizumab dopo la prima progressione nel trattamento del mCRC.<sup>109</sup>

Più recentemente tra i vari farmaci antiangiogenici a disposizione per il trattamento del mCRC è stato approvato anche aflibercept, la cui efficacia in associazione alla chemioterapia è stata testata nello studio di fase III VELOUR. Questo farmaco è una proteina ricombinante di fusione costituita dal dominio extracellulare di VEGF-R, capace legare in fattori circolanti VEGF-A, VEGF-B e placentar growth factor (PlGF). 1226 pazienti precedentemente trattati con un regime a base di oxaliplatino, sono stati randomizzati a ricevere FOLFIRI +/- aflibercept. Nel braccio sperimentale la mOS obiettivo primario dello studio è stata di 13.5 mesi rispetto ai 12.0 mesi del braccio di controllo (HR=0.81 95.34%CI 0.71-0.93 p=0.003). L'aggiunta di aflibercept alla chemioterapia incrementava anche la mPFS (6.9 vs 4.6 mesi rispettivamente, HR=0.75 95%CI 0.66-0.86 p<0.0001) e il RR (19.8% vs 11.1% rispettivamente p<0.0001). Aflibercept ha profilo di tossicità simile a quello degli altri anti-VEGF tuttavia sembra incrementare le tossicità chemio-correlate.<sup>124</sup>

All'ultimo congresso internazionale ASCO GI sono stati presentati i risultati dello studio di fase III RAISE, che valutava l'efficacia di ramucirumab associato al FOLFIRI in seconda linea nel trattamento di pazienti con mCRC precedentemente trattati con

bevacizumab, oxaliplatino e fluoropirimidine. Ramucirumab è un anticorpo monoclonale ricombinante capace di bloccare la via del VEGF-R2. 1072 pazienti sono stati randomizzati a ricevere FOLFIRI +/- ramucirumab. La OS, obiettivo primario dello studio, è stata di 13.3 mesi nel braccio sperimentale e 11.7 mesi nel braccio trattato con la sola chemioterapia (HR=0.84 95%CI 0.73-0.98 p=0.02); anche la mPFS ha mostrato un incremento significativo (=5.7 vs 4.5 mesi, HR=0.79 95%CI 0.70-0.90 p=0.0005). In conclusione lo schema FOLFIRI + ramucirumab può rappresentare un'efficace alternativa nel trattamento dei pazienti progrediti a FOLFOX + bevacizumab.<sup>125</sup>

### **2.2.2 Farmaci Anti-EGFR: Cetuximab e Panitumumab**

EGFR è una proteina trans-membrana con una porzione intracellulare ad attività tirosin chinasi, una volta associata ad uno dei suoi ligandi può attivare numerose cascate proteiche tra cui quella della proteina RAS, coinvolta nella proliferazione cellulare. EGFR è espresso in più del 60% dei CRC. Il cetuximab è un anticorpo monoclonale chimerico di origine murina, diretto contro il dominio extracellulare dell'EGFR. Il farmaco previene il legame con uno dei ligandi di EGFR, epidermal growth factor (EGF) e inibisce quindi l'attivazione della tirosinchinasi a valle, inoltre può avere attività sinergica, sia in vitro che in vivo, con gli altri farmaci antineoplastici e la radioterapia.<sup>126</sup>

Lo studio di fase II BOND ha randomizzato 329 pazienti progrediti alla chemioterapia di prima linea con irinotecano a ricevere irinotecano e cetuximab o solo cetuximab. Il tasso di risposta è stato del 22.9% e del 10.8% nel braccio di combinazione e nel braccio con il solo anticorpo rispettivamente e la PFS mediana è risultata di 4.1 vs 1.5 mesi nei due bracci rispettivamente (p<0.001); l'OS mediana di 8.6 e 6.9 mesi nei due bracci rispettivamente. Questo studio ha dimostrato quindi che il cetuximab ha un'efficacia clinica sia da solo che in combinazione con irinotecano. L'effetto collaterale più frequente consisteva in una follicolite.<sup>105</sup> Sulla base di questi dati il cetuximab è stato registrato nel 2004 per il trattamento del mCRC EFGR positivo. Nel trattamento di prima linea lo studio di fase III CRYSTAL ha randomizzato 1198 pazienti mCRC con metastasi non resecabili a ricevere FOLFIRI e cetuximab o solo FOLFIRI. Il trattamento di combinazione riduceva il rischio di progressione del 15%

(HR=0.85 95%CI 0.72-0.99 p=0.048) mentre non è stata dimostrata nessuna differenza in termini di OS (p=0.44).<sup>110</sup>

Un secondo anticorpo monoclonale anti EGFR, panitumumab, è stato registrato dall'FDA nel 2006 per il trattamento dei mCRC pretrattati. Lo studio registrativo ha randomizzato pazienti progrediti ai regimi chemioterapici standard a ricevere panitumumab o le sole cure di supporto (BSC). La PFS obiettivo primario dello studio è significativamente incrementata dall'utilizzo di panitumumab (HR=0.54 95% CI 0.44-0.66 p<0.0001) così come il RR (10% vs 0% p=0.0001) nei 2 bracci rispettivamente.<sup>107</sup> In seguito all'approvazione dei due farmaci la crescente conoscenza del pathway di EGFR ha portato allo sviluppo di una serie di studi volti ad indagare il ruolo di markers e/o caratteristiche genetiche che permettessero di identificare sottogruppi di pazienti con mCRC che beneficiavano maggiormente dell'uso dei farmaci anti-EGFR. Le prime esperienze provenienti da analisi retrospettive e post-hoc di studi randomizzati hanno identificato la mutazione attivante dell'esone 2 di *KRAS* come principale fattore di resistenza ai farmaci anti-EGFR. Tale proteina situata a valle della via di trasduzione del segnale di EGFR, quando mutata determina un'attivazione costitutiva della via molecolare sottostante rendendo inefficace l'inibizione di EGFR a monte.<sup>127</sup> Tali studi hanno portato alla modifica della label dei farmaci anti-EGFR che erano indicati solo in pazienti che non presentavano mutazioni dell'esone 2 di *KRAS*.

Più recentemente altre mutazioni attivanti di RAS sono state identificate come fattori di resistenza ai farmaci anti-EGFR. Le prime indicazioni derivano da uno studio retrospettivo che ha valutato il ruolo di mutazioni rare di *KRAS*, *BRAF*, *NRAS* e *PIK3CA* in una ampia popolazione di pazienti con mCRC trattati con cetuximab in Europa prima della selezione molecolare. Questa analisi ha dimostrato che pazienti con tali mutazioni presentavano un tasso di risposte inferiore rispetto ai pazienti wild-type.<sup>128</sup> Numerosi studi successivi hanno confermato tali osservazioni, ma le evidenze che hanno portato ad una ulteriore modifica della label del farmaco (che ha ristretto l'indicazione dei farmaci anti-EGFR ai pazienti *RAS* wild type negli esoni 2, 3 e 4) derivano dalle analisi molecolari estese effettuate per lo studio PRIME.<sup>129</sup> Il trattamento con panitumumab in associazione a FOLFOX aveva già dato risultati promettenti in pazienti *KRAS* esone 2 wild-type,<sup>46</sup> tuttavia una recente analisi retrospettiva-prospettica ha valutato nuovamente l'efficacia del farmaco selezionando

ulteriormente i pazienti sulla base del profilo molecolare. 639 pazienti *KRAS* wild-type sono stati valutati per le mutazioni di *KRAS* (esone 3 e 4), *NRAS* (esone 2, 3 e 4) e *BRAF* (esone 15). In 512 pazienti *RAS* wild type la mPFS è stata di 10.1 mesi e 7.9 mesi nel braccio con FOLFOX + panitumumab e nel braccio con FOLFOX rispettivamente (HR=0.72 95%CI 0.58-0.90 p=0.004), l'OS mediana è stata di 26.0 e 20.2 mesi nei due bracci rispettivamente (HR=0.78 95%CI 0.62-0.99 p=0.04). L'analisi nel sottogruppo di pazienti mutati ha mostrato un effetto detrimentalmente dall'aggiunta dell'anticorpo.<sup>130</sup> Recentemente sono stati pubblicati anche i risultati delle analisi retrospettive condotte sui pazienti dello studio CRYSTAL. Anche in questo caso l'analisi molecolare è stata allargata all'esone 3 e 4 di *KRAS* e all'esone 2, 3, 4 di *NRAS*. Lo stato mutazionale era valutabile nel 64.6% dei 666 pazienti con esone 2 di *KRAS* wild-type; in questo gruppo di pazienti il 14.7% era portatore di una mutazione di *RAS* non precedentemente testata. Nei pazienti con tumori *RAS* wild-type, è stato confermato un beneficio dall'aggiunta di cetuximab a FOLFIRI (mOS=28.4 vs 20.2 mesi, HR=0.69 95%CI 0.54-0.88).<sup>131</sup>

In conclusione attualmente, l'utilizzo dei farmaci anti-EGFR nel trattamento dei pazienti con mCRC non può prescindere da un'analisi molecolare estesa del gene *RAS*.<sup>132</sup>

La combinazione FOLFOXIRI con anti EGFR è stata indagata in alcuni studi di fase II. Inizialmente gli studi hanno mostrato qualche criticità dovuta all'incremento delle tossicità causato dall'utilizzo di tale schema, nonostante ciò i dati in termini di attività e di tasso di resezione erano piuttosto promettenti anche in popolazioni di pazienti non selezionato da punto di vista molecolare<sup>133, 134</sup> Lo studio di fase II TRIP ha testato l'attività di FOLFOXIRI e panitumumab in una popolazione di pazienti altamente selezionata dal punto di vista molecolare in 37 pazienti non resecabili *KRAS/BRAF/NRAS/HRAS* wild-type. I risultati in termini di risposte sono stati piuttosto incoraggianti, il RR è stato dell'89%, il tasso di resezioni del 35%. Tuttavia in questo studio la dose di 5FU è stata ridotta a causa dell'insorgenza di tossicità gastrointestinale severa in 2 dei primi tre pazienti randomizzati.<sup>135</sup> Attualmente lo studio di fase II MACBETH sta valutando la sicurezza e l'efficacia in prima linea di un regime modificato di FOLFOXIRI + cetuximab in pazienti *RAS* e *BRAF* wild-type. Le prime analisi hanno fornito risultati incoraggianti sia intermini di tossicità che in termini di efficacia.<sup>136</sup> In conclusione la tripletta associata al bevacizumab rappresenta oggi

una reale opzione di trattamento in pazienti con mCRC, mentre la combinazione con i farmaci anti-EGFR è raccomandata solo nell'ambito di studi clinici.

L'efficacia degli anti-EGFR è stata valutata anche in linee successive alla prima. Nell'ambito dello studio di fase III EPIC 1298 pazienti con mCRC progrediti al regime FOLFOX sono stati randomizzati a ricevere irinotecano +/- cetuximab. La mOS, obiettivo primario dello studio era equiparabile nei due gruppi (HR=0.975 95%CI 0.85-1.11 p=0.71) mentre la PFS e il RR erano significativamente incrementati nel braccio della combinazione (mPFS=4.0 vs 2.6 mesi, HR=0.692 95%CI 0.61-0.77 p<0.0001; RR=16.4% vs 4.2% p<0.0001). Tuttavia in questo trial i pazienti non sono stati selezionati in base alla mutazione di *KRAS*.<sup>137</sup> Successivamente l'efficacia dei farmaci anti-EGFR in seconda linea è stata valutata anche nello studio di fase III 2005-181. In questo studio 1186 pazienti pretrattati con fluoropirimidine sono stati sottoposti a FOLFIRI +/- panitumumab. Obiettivo primario dello studio erano la OS e la PFS e i risultati sono stati stratificati in base alla mutazione di *KRAS*. Nel sottogruppo *KRAS* wild-type l'aggiunta dell'anticorpo alla chemioterapia aveva comportato un significativo incremento della PFS (5.9 vs 3.9 mesi HR=0.73 95%CI 0.59-0.90 p=0.004), mentre nessun beneficio è stato osservato nei pazienti *KRAS* mutati (mPFS=5.0 vs 4.9 mesi HR=0.85 95%CI 0.68-1.06 p=0.14). Nei pazienti *KRAS* wild-type la OS mediana non ha mostrato variazioni significative (mOS=14.5 vs 12.5 mesi HR=0.85 95%CI 0.70-1.04 p=0.12), mentre il tasso di risposte è stato incrementato nel braccio con panitumumab rispetto (RR= 35% vs 10%) nei due bracci rispettivamente. Nei pazienti sottoposti al trattamento sperimentale si sono verificati i noti effetti collaterali dovuti all'utilizzo dell'anticorpo.<sup>138</sup> Infine nello studio PICCOLO è stata valutata l'efficacia in seconda linea dell'irinotecano associato a panitumumab in pazienti con mCRC progrediti alle fluoropirimidine. Sono stati randomizzati 460 pazienti *KRAS* wild-type per i codoni 12, 13 e 61. La OS, endpoint primario dello studio, non presentava modificazioni significative tra i due gruppi (HR=1.01 95%CI 0.83-1.23 p=0.91) mentre i pazienti trattati con irinotecano e panitumumab hanno avuto un beneficio in termini sia di PFS (HR=0.78 0.64-0.95 p=0.015) che di RR (34% vs 12% p<0.0001) rispetto ai pazienti trattati con solo irinotecano.<sup>139</sup>

Nessuno degli studi sopracitati ha determinato un vantaggio in termini di OS dall'aggiunta dei farmaci anti-EGFR in seconda linea. Probabilmente tali dati andranno rivalutati alla luce delle analisi molecolari estese. Tuttavia è anche doveroso puntualizzare che al momento vista l'attività citoriduttiva, questi farmaci trovano spazio importante soprattutto nella prima linea di trattamento. Sono in corso studi prospettici che valutano l'efficienza del ritrattamento con anti-EGFR che permetteranno di valutare al meglio il corretto timing per la somministrazione di tali farmaci.

## **2.3 Scelta della strategia terapeutica nel paziente con mCRC**

### **2.3.1 Terapia di prima linea**

La scelta della prima linea di trattamento rappresenta un punto di partenza cruciale nella terapia del tumore coloretale metastatico. Il valore strategico di tale scelta è legato a tre ragioni principali 1) in alcuni casi è possibile ottenere una completa guarigione, 2) è importante cercare di e ritardare il più possibile la progressione tumorale e controllare i sintomi della malattia, 3) i pazienti dopo una prima linea efficace potranno beneficiare di ulteriori trattamenti sia farmacologici che locoregionali (radioterapia o chirurgia). Come emerso nel precedente paragrafo, negli ultimi anni sono emersi numerosi regimi terapeutici utilizzabili in prima linea, rendendo più complessa la scelta della chemioterapia e del farmaco biologico più efficaci.

La scelta del regime terapeutico più appropriato non può prescindere dalla valutazione delle caratteristiche cliniche del paziente e dallo studio del profilo biomolecolare della neoplasia. È necessario valutare:

- l'età
- il performance status
- il carico di malattia e la sua aggressività
- lo stato mutazionale di *RAS* e *BRAF*.

Attualmente nella maggior parte dei pazienti lo standard terapeutico è rappresentato da una doppietta di citotossici (FOLFOX o FOLFIRI) associata ad un farmaco biologico. La scelta tra gli anti-EGFR e gli anti-VEGF è ancora controversa nei

pazienti *RAS* wild-type e al momento i principali studi che hanno confrontato anti-EGFR e gli anti-VEGF in associazione a una doppietta nella chemioterapia di prima linea non hanno dato risultati del tutto conclusivi.

Lo studio di fase III FIRE-3 ha randomizzato 592 pazienti *KRAS* (esone 2) wild-type affetti da mCRC a ricevere FOLFIRI + cetuximab o FOLFIRI + bevacizumab. La ORR, obiettivo primario, non presentava sostanziali differenze in nei due bracci (62% vs 58%  $p=0.18$ ) così come la PFS (10 vs 10.3 mesi  $p=0.55$ ). Un vantaggio significativo è stato osservato in termini di OS nel braccio trattato con cetuximab (28.7 vs 25.0 mesi  $HR=0.77$  95%CI 0.62-0.96  $p=0.017$ )<sup>140</sup>

Lo studio CALGB ha randomizzato 1137 pazienti *KRAS* wild-type (esone 2) a ricevere bevacizumab o cetuximab in associazione a una doppietta chemioterapica comprendente 5FU. L'OS, obiettivo primario dello studio, è stata di 29.0 mesi nei pazienti trattati con chemioterapia e bevacizumab vs 29.9 mesi nei pazienti trattati con chemioterapia e cetuximab ( $HR=0.92$  95%CI 0.78-1.09  $p=0.34$ ) e anche la PFS non ha mostrato differenze significative (10.4 vs 10.8 mesi,  $HR=1.04$  95%CI 0.91-1.17  $p=0.55$ ) nei due bracci.<sup>141</sup>

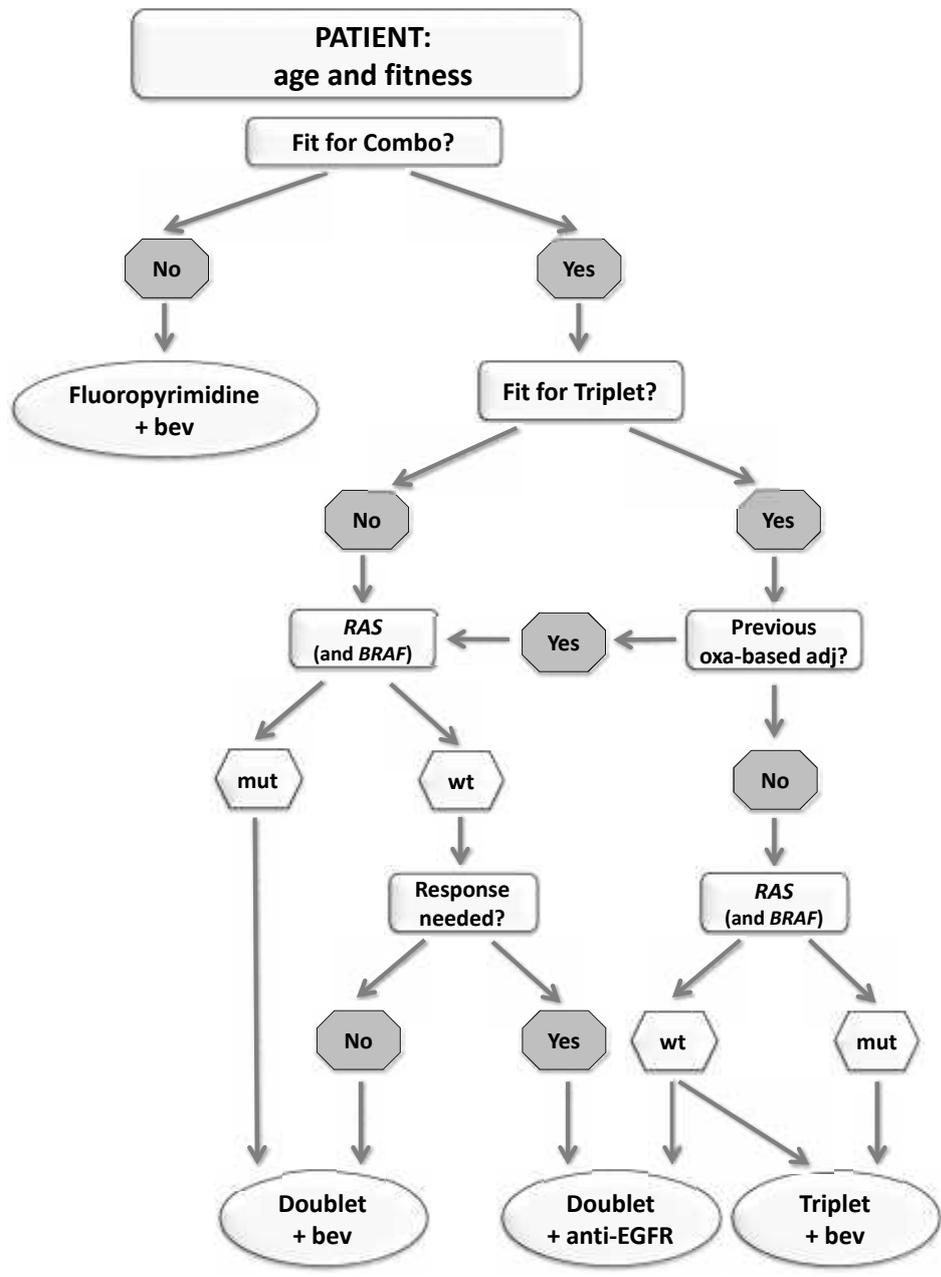
Entrambi gli studi non hanno raggiunto l'obiettivo primario. L'analisi molecolare estesa in entrambi gli studi ha confermato i risultati precedentemente riportati. Più recentemente qualche indicazione interessante è stata ottenuta con la presentazione dei dati sulla risposta precoce ovvero valutata dopo 6 settimane di terapia. In un sottogruppo di pazienti trattati nell'ambito dello studio FIRE 3, coloro che hanno ricevuto FOLFIRI e cetuximab hanno mostrato un maggior tasso di risposte precoci. Sulla base di tali osservazioni, seppure retrospettive e provenienti da un sottogruppo di pazienti è possibile affermare che quando è necessaria una risposta rapida, nei pazienti *RAS* wild-type, è preferibile utilizzare l'anti-EGFR.<sup>54</sup>

Recentemente i risultati del sopracitato studio TRIBE hanno reso disponibile una nuova opzione terapeutica in prima linea che deve essere scelta in pazienti selezionati sulla base dei principali criteri di inclusione dello studio:

- pazienti con malattia metastatica non suscettibile di resezione chirurgica
- età <75 anni e PS 2 (soggetti con età compresa tra 70-75 anni PS=0)
- pazienti non precedente sottoposti a adiuvante a base di oxaliplatino

Nei pazienti unfit per trattamenti di combinazione è possibile optare per la monochemioterapia. In assenza di controindicazioni specifiche l'associazione 5FU/bevacizumab costituisce lo standard quando è richiesto un regime meno intenso come ad esempio nei pazienti anziani.<sup>119</sup>

Di seguito è riportato un algoritmo che riassume le possibili strategie terapeutiche da impiegare in prima linea di trattamento



### 2.3.2 Linee successive

La scelta della strategia terapeutica in seconda linea nel trattamento del mCRC è fortemente influenzata dai farmaci utilizzati in prima linea. Il crescente interesse verso terapie individualizzate e le numerose opzioni percorribili con la prima linea di trattamento rendono la scelta della terapia di seconda linea (e delle linee successive) sempre più complessa ma rilevante, infatti studi recenti hanno dimostrato che terapie eseguite in linee successive alla prima possono determinare un aumento della sopravvivenza e un miglioramento/mantenimento di una buona qualità della vita nei pazienti con malattia avanzata. Come nella prima linea il panorama delle varie opzioni percorribili comprende chemioterapia esclusiva, farmaci anti-VEGF in associazione a chemioterapia, o farmaci anti-EGFR da soli o in associazione a chemioterapia.

Per quanto riguarda i farmaci citotossici, in molto casi nella pratica clinica si ricorre al cosiddetto “switch della chemioterapia”, ovvero si passa da una doppietta a base di oxaliplatino a una doppietta a base di irinotecano o viceversa.<sup>142</sup> Per quanto riguarda i farmaci biologici la scelta è dettata dal tipo di farmaco a target molecolare utilizzato in prima linea e dallo stato mutazionale di *RAS*.

Per quanto riguarda gli antiangiogenetici i dati degli studi E3200 e VELOUR dimostrano un beneficio significativo nell’impiego di un anti-VEGF in seconda linea rispetto alla sola chemioterapia, indipendentemente da una precedente esposizione a bevacizumab.<sup>143,106,122</sup> Come precedentemente descritto gli studi TML e BEBYP hanno dimostrato che la prosecuzione di bevacizumab oltre la progressione determina un beneficio clinico rilevante.<sup>109</sup>

Al momento nei pazienti *RAS* wild type lo spazio in seconda linea per i farmaci anti EGFR è piuttosto limitato, visti i risultati degli studi di fase III EPIC, 2005-181 e PICCOLO.<sup>137, 139</sup>

Più promettenti e incoraggianti, sono i risultati che hanno ottenuto i farmaci anti-EGFR in linee successive alla seconda. Lo studio CO.17 ha valutato l’efficacia di cetuximab vs terapia di supporto esclusiva. In questo trial è stato dimostrato un beneficio sia in termini di OS che di PFS anche in una popolazione non altamente selezionata dal punto di vista molecolare ovvero in pazienti con esone 2 di *KRAS* wild-type (mOS 9.5 vs 4.6 mesi, HR=0.55 95%CI 0.41-074 p<0.0001).

La tabella seguente riassume i risultati dei trial più importanti che hanno valutato l'efficacia della chemioterapia in associazione o meno ai farmaci biologici

Nome studio	Disegno	Fase	Endpoint primario	OS	PFS
<u>EPIC</u>	CPT +/- cetuximab	III	OS	10.7 vs 10.0 * HR=0.975 p=0.71	4.0 vs 2.6 * HR=0.69 p 0.0001
<u>E3200</u>	FOLFOX4 +/- bevacizumab	III	OS	12.9 vs 10.8 * HR=0.75 p=0.0001	7.3 vs 4.7 * HR=0.61 p<0,0001
<u>20060314</u>	FOLFIRI +/- panitumumab	III	OS	14.5 vs 12.5 * HR=0.95 p=0.12	5.9 vs 3.9 * HR=0.73 p =0.004
<u>TML</u>	FOLFIRI/FOLFOX +/- bevacizumab	III	OS	11.2 vs 9.8 * HR=0.81 p=0.0062	5.7 vs 4.1 * HR=0.68 p<0.0001
<u>VELOUR</u>	FOLFIRI +/- afibercept	III	OS	13.5 vs 12.6 * HR=0.817 p=0.0032	6.9 vs 4.6 * HR=0.76 p<0.001
<u>RAISE</u>	FOLFIRI +/- ramucirumab	III	OS	13.3 vs 11.7* HR=0.84 p=0.021	5.7 vs 4.5* HR=0.79 p=0.0005

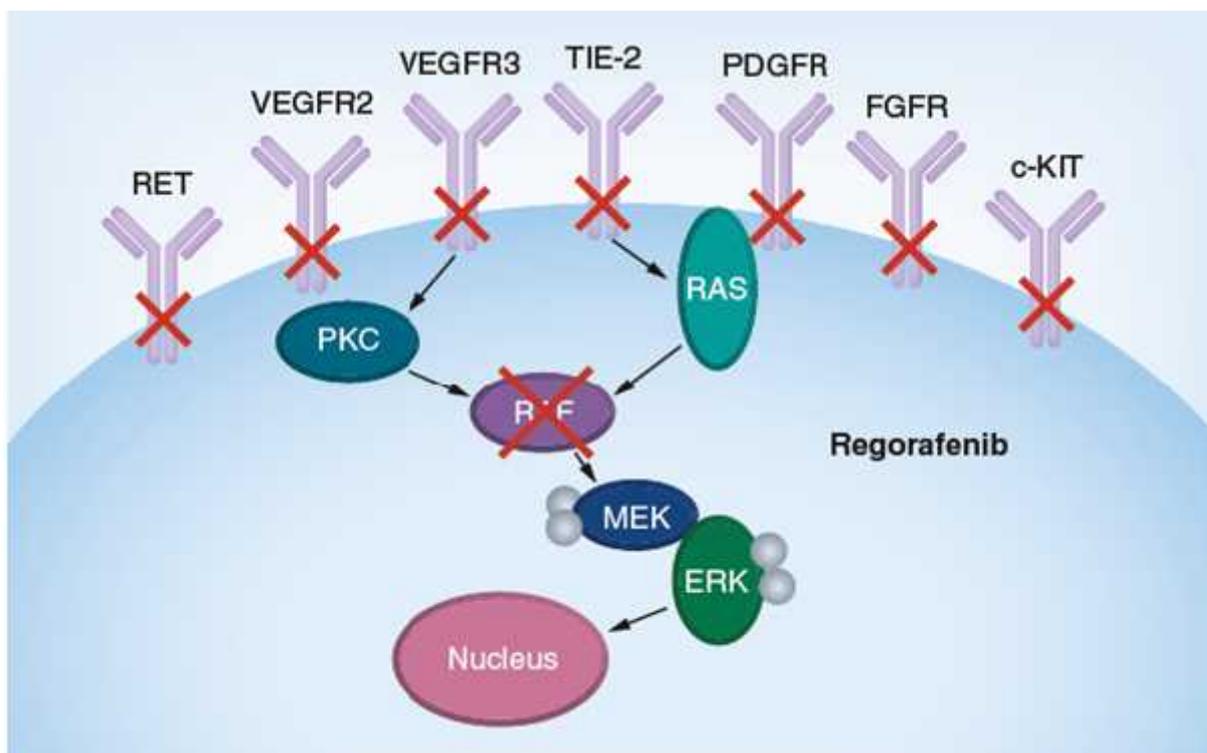
\* mesi.

## 2.4 Regorafenib

Una percentuale considerevole di pazienti con mCRC dopo aver esaurito i trattamenti convenzionali, precedentemente citati, continua a mantenere buone condizioni generali. In questi casi è forte l'esigenza di proseguire il trattamento con farmaci attivi ed efficaci. Alcuni studi clinici hanno valutato l'efficacia di farmaci in questo setting e solo recentemente dopo numerosi fallimenti, grazie ai risultati dello studio CORRECT, regorafenib un inibitore chinasiico multitarget ha dimostrato di essere efficace ed è stato registrato per il trattamento dei pazienti con mCRC precedentemente sottoposti ad una terapia a base di fluoropirimidine, oxaliplatino, irinotecano, anti-VEGF e anti-EGFR (se RAS wild-type).<sup>108</sup> Tale molecola agendo su numerosi recettori biologici è in grado di inibire la progressione neoplastiva andando ad agire su angiogenesi, oncogenesi e microambiente tumorale.

In particolare i target molecolari ai quali si devono le proprietà antiangiogenetiche del farmaco sono *VEGFR-1*, *VEGFR-2*, *VEGFR-3*, e *Tie-2*, quelli coinvolti nell'oncogenesi sono *c-KIT*, *RET*, *RAF-1*, *BRAF*, mentre l'inibizione di *PDGFR $\beta$*  (platelet derived growth factor  $\beta$  receptor) e *FGFR* (fibroblast growth factor receptor) è capace di indurre modificazioni del microambiente tumorale.<sup>144</sup>

La figura sottostante illustra schematicamente il meccanismo d'azione del farmaco:



Dopo promettenti studi preclinici regorafenib è stato rapidamente studiato nelle fasi successive della sperimentazione clinica. Il primo dose-escalation trial di fase I per testare la sicurezza del farmaco nell'uomo, ha coinvolto 53 pazienti con diverse neoplasie solide maligne.<sup>145</sup> L'incremento della dose è stato interrotto a 220mg/die, senza aver formalmente raggiunto la massima dose tollerata. In termini di attività il controllo di malattia è stato ottenuto in 35 pazienti (66%) e 3 di essi hanno mostrato una risposta parziale (un paziente con carcinoma a cellule chiare, uno con osteosarcoma e uno con carcinoma del colon). Sulla base dei risultati incoraggianti ottenuti nel gruppo di 15 pazienti affetti da mCRC in questo trial, è stata pianificata un'espansione della coorte di pazienti con mCRC e sono stati trattati 23 pazienti aggiuntivi, (38 pazienti totali). In questa analisi è stata osservata risposta parziale in un paziente (4%) e stabilità di malattia in 19 (70%) pazienti su 27 valutabili.<sup>146</sup>

Gli effetti collaterali di grado 3 o 4 più frequenti sono stati: ipertensione, diarrea, rash cutaneo e sindrome della mano piede (HFSR). Considerando la sua funzione antiangiogenetica, il tentativo di identificare markers dinamici di attività biologica del farmaco ha impiegato due tecniche: la misurazione dei livelli plasmatici di VEGF e della frazione solubile di VEGFR-2 (sVEGFR-2) e la stima della perfusione tumorale mediante DCE-MRI (Dynamic contrast-enhanced MRI). È stata osservata una significativa modulazione inversa dei valori di VEGF e di sVEGFR-2; mentre VEGF aumentava durante il trattamento con regorafenib, i livelli di sVEGFR-2 si riducevano secondo un pattern dose-dipendente. Gli studi con DCE-MRI hanno dimostrato una riduzione della captazione di gadolinio durante il trattamento che è stata confermata anche nella coorte di espansione in cui sono stati trattati pazienti con mCRC.<sup>146</sup> Non sono però state osservate correlazioni tra le modificazioni riscontrate alla DCE-MRI e la PFS.

In termini di farmacocinetica, l'attività di regorafenib e dei due metaboliti M2 e M5 sono stati osservati nel trial di dose escalation e nella coorte di espansione. I valori plasmatici più elevati sono stati registrati dopo 1-6 ore, 6-8 ore e 24 ore dalla somministrazione. L'emivita di regorafenib e di M2 si attesta intorno a 20-40 ore, ciò spiega l'osservazione di un incremento delle concentrazioni del farmaco e dei suoi metaboliti dopo multiple dosi di somministrazione. Il metabolita M5 è eliminato più lentamente rispetto agli altri due, e ha quindi, mostrato un importante fenomeno di accumulo dopo somministrazioni ripetute. È stata inoltre dimostrata una variabilità

significativa della farmacocinetica del farmaco, più accentuata sul piano interindividuale che intraindividuale.

Dopo questi incoraggianti risultati, è stato pianificato uno studio internazionale randomizzato di fase III, il CORRECT trial, che ha valutato l'efficacia di regorafenib verso placebo in pazienti con mCRC chemiorefrattari, ovvero già trattati con tutti i farmaci standard e progrediti durante o entro 3 mesi dall'ultima terapia.<sup>147</sup>

I pazienti, stratificati in base a precedenti trattamenti anti-VEGF, tempo tra diagnosi e la comparsa di malattia metastatica ( ≥ 18 mesi e <18 mesi), provenienza geografica, sono stati randomizzati (2:1 ratio) a ricevere regorafenib (160mg) o placebo una volta al giorno per 21 giorni ogni 28. L'endpoint primario dello studio era l'OS definita come il tempo dalla randomizzazione alla morte del paziente per qualsiasi causa; lo studio era stato disegnato per raggiungere il 33% di incremento nella OS. Assumendo una potenza del 90% e un errore  $\alpha=0.025$ , dovevano essere raggiunti 582 eventi. Gli endpoints secondari erano la PFS (definita come il tempo tra la randomizzazione e il primo dato clinico o radiologico di progressione di malattia), il RR (proporzione di pazienti con risposta completa o parziale), il disease control rate (proporzione di pazienti con migliore risposta completa o parziale e malattia stabile) e la sicurezza. Dall'aprile 2010 al marzo 2011, sono stati randomizzati 760 pazienti, 505 nel braccio con regorafenib, 255 nel braccio con placebo. L'obiettivo primario dello studio è stato raggiunto alla seconda analisi ad interim prepianificata (dopo il raggiungimento del 70% degli eventi attesi). È stata osservata una mOS di 6.4 vs 5.0 mesi nel gruppo di pazienti trattati con regorafenib vs placebo rispettivamente (HR=0.77 95%CI 0.64-0.94 p=0.0052). Nei due gruppi la PFS mediana è stata rispettivamente di 1.9 vs 1.7 mesi (HR=0.49 95%CI 0.42-0.58 p<0.0001). Le analisi di sottogruppo hanno dimostrato che il beneficio ottenuto con regorafenib era indipendente dall'età, dalla razza, dalla regione di provenienza, dal tempo intercorso tra la diagnosi e la comparsa di malattia metastatica dal performance status e dallo stato mutazionale di *KRAS*. Risposte parziali sono state osservate solo in 5 pazienti (1%) e un paziente (0.4%) nei due gruppi (p=0.19), mentre il controllo di malattia è stato raggiunto nel 41% e nel 15% dei pazienti (p<0.0001). Questi dati indicano che regorafenib è in grado di contribuire al controllo di malattia piuttosto che indurre una riduzione del volume tumorale. L'attività di regorafenib come "stabilizzatore di malattia" è in

accordo con le proprietà citostatiche degli altri antiangiogenetici, come ad esempio bevacizumab.<sup>148,149</sup>

L'argomento della valutazione della risposta è ancora ampiamente dibattuto, dato che esistono prove dell'inadeguatezza dei criteri radiologici convenzionali per la valutazione della risposta nei tumori solidi (RECIST) dopo il trattamento con farmaci antiangiogenetici. È stato suggerito che la valutazione delle modificazioni morfologiche avvenute durante il trattamento possa essere utile per avere una miglior stima dei reali effetti di questi farmaci.<sup>150,151</sup>

Sulla base dei risultati sopracitati la Food and Drug Administration (FDA) e la European Medical Agency (EMA) hanno approvato l'uso di regorafenib per il trattamento di pazienti con mCRC avanzato nel settembre 2012 e nel giugno 2013 rispettivamente.

Nel CORRECT trial il 93% dei pazienti del braccio sperimentale ha subito effetti collaterali dovuti al trattamento; il 54% dei pazienti ha riportato tossicità di grado 3 e 4. In accordo con i risultati dei trial precedenti, i più frequenti effetti collaterali di grado 3 e 4 sono stati HSFR (17%), astenia (10%), diarrea (7%), ipertensione (7%), rash o desquamazione cutanea (6%). Altri effetti collaterali furono: anoressia, modificazioni del tono di voce, mucosite orale, alterazioni della funzionalità epatica. Solitamente gli effetti comparivano durante il primo ciclo di trattamento e mostravano un'incidenza bassa o stabile durante i cicli successivi. Tutte le reazioni avverse erano gestibili con la riduzione o l'interruzione del trattamento, necessarie nel 67% dei pazienti trattati con regorafenib.<sup>152</sup> Pertanto è raccomandata la sorveglianza delle condizioni cliniche generali dei pazienti almeno ogni 2 settimane per i primi due mesi di terapia.

In particolare in caso di tossicità clinicamente evidenti, come già anticipato, lo schema terapeutico può essere rinviato o subire delle riduzioni.<sup>153</sup> L'interruzione temporanea è suggerita in caso di tossicità di grado 3 o HSFR di grado 2 ricorrenti, per ipertensione di grado 2 o qualsiasi evento avverso di grado 3 o 4. Le modificazioni della dose dovrebbero seguire le indicazioni in tabella.

**Table. 1. Levels for dose modifications of regorafenib.**

Dose level	Daily dose (mg)	Tablets (n)
Full dose	160	4
Dose level 1	120	3
Dose level 2	80	2

Livelli di modificazione delle dosi di regorafenib

È raccomandato ridurre il dosaggio a 120 mg/die dopo la prima manifestazione di HSFR di grado 2 o quando il trattamento viene ripreso dopo un rialzo delle transaminasi (AST/ALT) di grado 3 o dopo qualsiasi effetto collaterale di grado 3 o 4. È raccomandato ridurre il dosaggio a 80 mg/die se si ripresenta HSFR di grado 2 o dopo la ripresa del trattamento in pazienti che avevano presentato tossicità gravi. L'interruzione permanente è raccomandata in caso di mancata tolleranza alla dose giornaliera di 80mg, in caso di grave danno alla funzionalità epatica, o in qualsiasi altro caso di tossicità di grado 4.

Nuove informazioni saranno fornite dai risultati dello studio CONSIGN, uno studio di fase IIIb open-label che ha valutato ulteriormente il profilo di sicurezza del farmaco, nello stesso setting di pazienti trattati nell' ambito del CORRECT.

Nello studio randomizzato di fase III CONCUR è stata valutata l'efficacia di regorefenib nei pazienti con mCRC progrediti alle terapie standard di origine asiatica. 204 pazienti sono stati randomizzati a ricevere regorafenib vs placebo. Nel braccio sperimentale la OS e la PFS risultavano significativamente incrementate (mOS=8.8 vs 6.3 mesi, HR=0.550 95%CI 0.39-0.76 p=0.0002) (mPFS=3.2 vs 1.7 mesi, HR=0.31 95%CI 0.22-0.43 p<0.0001) confermando l'efficacia di regorafenib anche in questa popolazione di pazienti.<sup>154</sup>

Tuttavia numerose questioni restano aperte riguardo all'efficacia e al profilo di tossicità del farmaco. Infatti nonostante il trial CORRECT e CONCUR abbia raggiunto il suo endpoint primario e vi sia un vantaggio significativo in OS e PFS, il beneficio assoluto attribuibile a regorafenib risulta modesto (1.4 mesi in termini di OS e 0.2mesi in PFS). Inoltre valutando le curve della PFS, più del 50% dei pazienti nel braccio sperimentale sembra non beneficiare del trattamento.

Al fine di ottimizzare l'uso di regorafenib al momento sembra possibile percorrere due strade: da un lato è necessario individuare biomarkers che permettano di selezionare un sottogruppo di pazienti che possa beneficiare maggiormente del trattamento; dall'altro lato deve essere ancora stimata la sua efficacia in setting precoci e in combinazione con altri farmaci. Ad oggi i markers investigati non hanno fornito una chiara risposta. Uno studio recente ha impiegato la tecnologia BEAMing per l'identificazione a scopo predittivo delle mutazioni di *KRAS*, *PIK3CA* e *BRAF* nei tessuti tumorali e nei campioni di plasma basale di un sottogruppo di pazienti arruolati nel CORRECT trial. I dati, seppure retrospettivi e basati su analisi di sottogruppo, indicano che il beneficio derivante da regorafenib in termini sia di OS che PFS è indipendente dallo stato mutazionale di *KRAS* e *PIK3CA*. Inoltre il sottogruppo con mutazioni di *BRAF* non è stato valutato per l'esigua percentuale dei pazienti portatori della mutazione.<sup>155</sup> Uno studio di fase I su campioni di tessuto di pazienti mCRC asiatici di è tutt'ora in corso, con il fine di identificare marcatori molecolari di potenziale interesse, e compararli con gli esiti clinici.

Come prima suggerito, le proprietà antiangiogenetiche di regorafenib potrebbero essere sfruttate in modo migliore, modificando la sua indicazione ai setting precoci. Uno studio di fase Ib ha valutato la sicurezza e l'efficacia di regorafenib associato a FOLFOX o FOLFIRI come prima o seconda linea di trattamento del mCRC. 7 (18%) pazienti dei 38 valutabili hanno ottenuto una risposta parziale, mentre la malattia è rimasta stabile in 26 (69%) pazienti, con un disease control rate dell'87%. Il trattamento ha mostrato un profilo di tollerabilità accettabile e grazie a questi risultati sono stati disegnati studi di fase II per valutare l'attività dei regimi FOLFOX e regorafenib in prima linea<sup>156</sup> e FOLFIRI +/- regorafenib in seconda linea di trattamento.<sup>157</sup> Un'altra linea di ricerca potrebbe consistere nel tentativo di somministrare l'inibitore delle tirosinchinasi associato ad altri trattamenti antiangiogenetici in modo da studiare gli effetti di un'inibizione "a largo spettro" delle vie molecolari correlate all'angiogenesi.

Ad oggi, regorafenib costituisce l'unica opzione terapeutica registrata per i pazienti con mCRC refrattari alle terapie standard che mantengono buone condizioni generali. Tuttavia solo la metà dei pazienti trattati realmente beneficia del trattamento, quindi è necessario affinare la selezione dei pazienti in modo da

- 1) individuare coloro che hanno maggiori probabilità di avere un controllo di malattia
- 2) non esporre i pazienti a tossicità gravi
- 3) ottimizzare i costi della terapia.

## CAPITOLO 3: I miRNA circolanti nel carcinoma coloretale

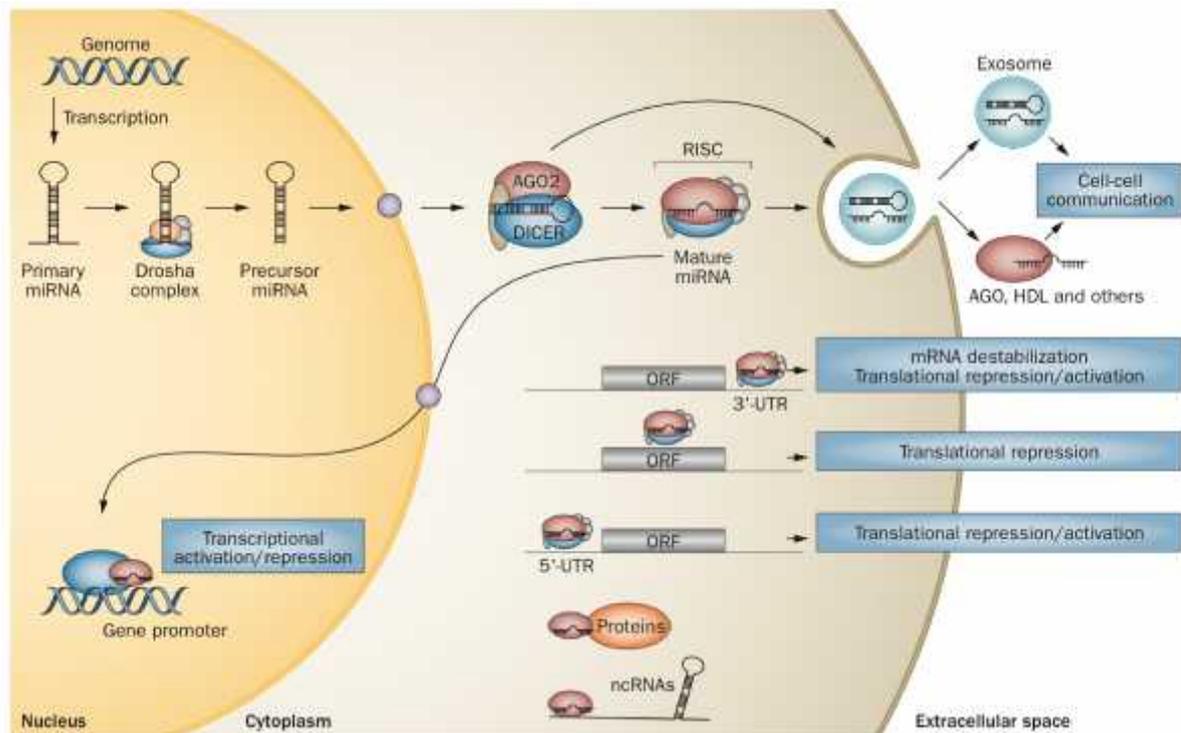
### 3.1 Generalità

I microRNA (miRNA) sono molecole formate da un singolo filamento di RNA non codificante che può avere una lunghezza variabile da 19 a 25 nucleotidi (nt). Nel complesso, l'1% del genoma umano è costituito dai miRNA e queste sequenze risultano altamente conservate in molti organismi. I miRNA hanno un ruolo importante nello sviluppo, nella regolazione del metabolismo, nella differenziazione, nella proliferazione e nella regolazione del ciclo cellulare; sono inoltre implicati in numerose patologie, come infezioni virali, malattie cardiovascolari e neoplasie. I miRNA regolano l'espressione di più del 50% dei geni codificanti a livello post-trascrizionale, agendo su migliaia di RNA messaggeri.<sup>158</sup>

### 3.2 Biosintesi dei miRNA

I miRNAs vengono trascritti nel nucleo dalla RNA polimerasi II a partire da regioni introniche di geni codificanti proteine. Il miRNA risultante "primary miRNA" viene complessato con due proteine (Drosha RNAasi III endonucleasi e DGCR8) e successivamente clivato in modo da formare il miRNA precursore, chiamato "pre-miRNA". Questa molecola di 60-110nt è trasportata nel citoplasma e processata dalla RNA III endonucleasi Dicer, in questo modo si ottiene una struttura di RNA a doppio filamento di circa 22 nt; nel citosol i due filamenti di RNA vengono separati e il singolo filamento maturo viene inserito nel complesso silenziante RNA indotto (RISC). A questo punto si è formato il "miRNA maturo" che è in grado di interagire con i siti di legame su mRNA target. I miRNA maturi nel citoplasma si legano principalmente alla regione 3'-UTR di mRNA ma possono anche legarsi alla regione open reading frame (ORF) oppure alla regione 5'-UTR degli mRNA target, con ciascuno di questi legami possono influenzare la traduzione proteica. Affinchè si leghino al loro mRNA target, è sufficiente una breve sequenza di nucleotidi (2-7 nt). In particolare i miRNA possono interferire con l'espressione genica in due modi: nel caso di un *legame completo* alla sequenza complementare, l'mRNA target viene degradato, più spesso invece i miRNA legano *in modo incompleto* la regione target dell' mRNA e questo comporta il silenziamento della traduzione o la deadenilazione del target. Infine i miRNA possono legarsi alle regioni promoter nel nucleo

determinando attivazione o repressione di geni target.<sup>159</sup> La figura seguente illustra in maniera schematica le fasi dalla biosintesi dei miRNA.



### 3.3 Ruolo dei mirna nelle patologie tumorali

Come già accennato, i miRNA costituiscono una delle più grandi classi di molecole regolatorie e sono potenzialmente coinvolti in tutti i processi biologici;<sup>158</sup> dato che un singolo miRNA può modulare in modo positivo o negativo numerosi mRNA target, le alterazioni nell'espressione dei miRNA sono coinvolte nelle fasi di iniziazione e progressione del cancro, oltre che di altre malattie. Più del 50% dei miRNA umani sono localizzati in regioni cromosomiche che presentano amplificazioni di DNA, delezioni o traslocazioni durante lo sviluppo tumorale. Gli studi sui profili di espressione dei miRNA hanno dimostrato che in tutti i tipi di neoplasie esiste uno specifico profilo di miRNA upregolati e down regolati.<sup>160, 161</sup> Inoltre è stato osservato che esiste un profilo di espressione dei miRNA diverso tra tessuto sano e neoplastico, ad esempio nel tumore del colon sono stati riscontrati bassi livelli tissutali di miR-143 e miR-145 rispetto a quelli riscontrati nella mucosa colica sana.<sup>162</sup>

Nel cancro i miRNA possono funzionare sia come oncogeni (*oncomir*) che come oncosoppressori (*tumor suppressor miRNA*). In diversi tumori solidi è stato dimostrato che la riduzione dei livelli di miRNA implicati nella soppressione tumorale conduce ad un'overespressione di miRNA oncogenici che intervengono in vari meccanismi a livello cellulare come l'inibizione dell'apoptosi, la proliferazione cellulare, la trasformazione epitelio-mesenchimale e lo sviluppo di metastasi.<sup>163</sup> Ad esempio i tumor suppressor *miRNA* sono i membri della famiglia del miR-34 che causano l'attivazione di p53, responsabile dell'apoptosi<sup>164</sup> e i miRNA della famiglia let-7 che inibiscono l'espressione dell'oncogene *KRAS*;<sup>165</sup> mentre tra gli *oncomir* è descritto il miR-21 che quando upregolato determina l'inibizione dell'oncosoppressore *PTEN*.<sup>166</sup>

Alcuni miRNAs sono overespressi o downregolati esclusivamente o preferenzialmente in alcune tipologie di tumori. Questa specificità assieme alla capacità di poterli individuare in una vasta gamma di campioni ( dai tessuti fissati con formalina, al plasma, ad altri fluidi corporei come le urine, la saliva, il liquido seminale, amniotico e l'essudato pleurico) rende i miRNA potenzialmente utilizzabili come biomarkers efficaci nella diagnosi precoce di neoplasie, definizione della prognosi e della risposta al trattamento.<sup>163</sup>

### **3.4 MiRNA circolanti come biomarkers**

Come detto in precedenza i miRNA sono espressi sia nei tessuti sia nei fluidi corporei sotto forma di miRNA circolanti. Nel 2008 è stato pubblicato il primo studio che ha identificato la correlazione tra i livelli sierici di miR-21 e la sopravvivenza in pazienti affetti da linfoma diffuso a cellule B.<sup>167</sup> Da quel momento in poi più di 100 studi hanno valutato il potenziale ruolo dei miRNA plasmatici come biomarkers in diversi tipi di neoplasie. Ad oggi si può affermare che tali molecole sono a tutti gli effetti considerate biomarcatori nella diagnosi delle neoplasie, ma sono utili anche nella definizione della prognosi e della risposta al trattamento.

Prima di passare ai dettagli sul ruolo dei miRNA circolanti è utile descrivere il modo in cui queste molecole vengono rilasciate nel sangue. Uno dei meccanismi descritti è rappresentato dalla morte delle cellule tumorali, dovuta a necrosi o apoptosi, che

comporta il rilascio dei miRNA nel sangue. Tra gli altri meccanismi descritti, c'è la secrezione attiva. Un ruolo altrettanto importante nel rilascio dei miRNA circolanti è svolto da molecole chiamate esosomi. Dopo la trascrizione nel nucleo i miRNA possono essere processati all'interno dei cosiddetti 'corpi multivescicolari', costituiti da membrane fosfolipidiche e contenenti oltre ai miRNA anche RNA e proteine, sottoforma di microvescicole lipoproteiche di 30-100 nm (esosomi).<sup>168</sup> Una volta che i corpi multivescicolari si legano alla membrana plasmatica i miRNA vengono rilasciati all'interno degli esosomi nella circolazione sanguigna. E' proprio grazie alla presenza degli esosomi che i miRNA circolanti risultano stabili nel plasma, anche dopo essere stati sottoposti a diverse condizioni che normalmente condurrebbero alla degradazione della maggior parte degli RNA, come ad esempio l'ebollizione, livelli estremi di pH e il congelamento. I miRNA all'interno degli esosomi sono protetti dall'eventuale digestione delle RNAsi e si possono ritrovare in tutti i fluidi corporei.<sup>168,</sup>  
<sup>169</sup> Numerosi studi hanno mostrato che per ogni tipo di neoplasia può essere identificato un profilo di espressione di miRNA circolanti peculiare, tale profilo si viene a determinare grazie al contributo sia delle cellule sanguigne circolanti sia delle cellule tumorali e grazie all'esistenza di esosomi tumore-derivati. Come detto in precedenza infatti la presenza dei miRNA e le loro variazioni possono essere espressione non solo di eventi patologici ma anche di condizioni fisiologiche. E' quindi importante per utilizzare i miRNA come biomarkers capire come si originano i miRNA cancro correlati nei liquidi corporei e cercare una "signature" specifica che permetta di distinguere soggetti sani da soggetti malati.<sup>170</sup>

Le tecniche laboratoristiche più frequentemente utilizzate per il rilevamento dei miRNA tissutali sono il northern blotting, l'ibridazione in situ, la RT-PCR, i microarray e il deep-sequencing. La quantificazione dei miRNA circolanti utilizza le stesse tecniche utilizzate per i miRNA tissutali, ma si differenzia per le minori quantità di materiale biologico di partenza su cui condurre l'analisi.<sup>159</sup> Tra le tecniche più utilizzate esistono differenze riassunte nella tabella di seguito:

<b>Principali tecniche per la quantificazione dei miRNA nei fluidi corporei.</b>		
<b>Tecniche</b>	<b>Vantaggi</b>	<b>Svantaggi</b>
<b><u>RT-PCR</u></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elevata sensibilità e specificità</li> <li>- Adatta per studi quantitativi</li> <li>- Semplice da eseguire non richiede laboratori attrezzati, nè personale qualificato</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Permette di processare un limitato numero di campioni con tempi lunghi</li> <li>Permette di identificare solo i mi-RNA noti/selezionati</li> </ul>
<b><u>Microarray</u></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Permette di processare un grandissimo numero di campioni in un tempo molto ridotto</li> <li>- Poco accurato per studi quantitativi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Permette di identificare solo i mi-RNA noti/selezionati</li> </ul>
<b><u>Deep sequencing</u></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Identifica miRNA non noti</li> <li>- Identifica varianti di splicing (isoMir)</li> <li>- Distingue miRNA con sequenze simili</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elevato costo</li> <li>- Necessari specifica attrezzatura e personale specializzato</li> <li>- Necessaria elevata quantità di materiale biologico</li> </ul>

Ad oggi sono numerosissimi i lavori che hanno identificato miRNA circolanti come possibili markers e la tabella 1 riassume i risultati più recenti e promettenti.

### **3.5 MiRNA nel carcinoma coloretale**

Nel CRC numerose evidenze hanno dimostrato che i miRNA influenzano la progressione tumorale regolando le fasi successive alla trascrizione e possono funzionare da oncogeni o oncosoppressori. In particolare influenzano le fasi precoci della tumorigenesi tramite la deregolazione della via APC e la progressione metastatica tramite quella della via di p53. Altre vie regolate dai miRNA sono quelle della transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e quella dell'angiogenesi.

Mir-21 gioca un ruolo rilevante sia nella regolazione della via di p53, sia nella via di EMT, tramite l'interazione con TGF. È stato infatti dimostrato che i livelli di espressione di miR-21 sono elevati in mCRC e regolano negativamente il recettore 2 di TGF che determina la riduzione della -catenina.<sup>171, 172</sup> Un ruolo importante nella regolazione dell'angiogenesi tumorale è svolto da miR-17 che interagisce con trombospondina-2 riducendone i livelli e così determinando uno stimolo proangiogenico e riducendo contemporaneamente l'attività del pathway mediato da

TGF-<sup>173</sup> Anche miR-34 è coinvolto nell'angiogenesi con un ruolo anti-angiogenico e bassi livelli di espressione sono stati riscontrati in pazienti affetti da CRC.<sup>58, 174</sup>

Tra i miRNA sopracitati, miR-17 e miR-34 hanno un ruolo principalmente diagnostico. In particolare uno studio interessante e ben condotto ha mostrato come elevati livelli di espressione sia circolanti che tissutali sono presenti in soggetti con CRC e che i livelli di espressione aumentano proporzionalmente allo stadio di malattia. Nello stesso studio miR-92 ha dimostrato di avere specificità pari a 70% e sensibilità pari a 89% nel predire la presenza di malattia. Tali valori di sensibilità e specificità sono estremamente elevati e quasi sovrapponibili a quelli dei test utilizzati ad oggi nella prevenzione secondaria.<sup>175</sup>

MiR-21 invece ha un ruolo sia come marker diagnostico che prognostico e predittivo di risposta al trattamento. Inoltre miR-21 è reso particolarmente interessante dal fatto che i livelli di espressione tissutali correlano con quelli circolanti associati e dal fatto che i dati sul suo ruolo di biomarker sono stati confermati in numerosi studi. In uno degli studi più noti e rilevanti Toyama et al hanno valutato il possibile ruolo diagnostico e prognostico di miR-21 circolante e tissutale. In questo studio è stata dimostrata la presenza di un'associazione statisticamente significativa tra i livelli di espressione di miR-21 nella lesione primitiva e nel plasma dei pazienti. Inoltre miR-21 risultava upregolato nel plasma di pazienti con CRC rispetto ai controlli sani ( $p < 0.001$ ). L'espressione diminuiva drasticamente nel plasma dei pazienti sottoposti a resezione curativa ( $p < 0.01$ ). Sia nei campioni tissutali che nei campioni plasmatici, elevati livelli di miR-21 erano associati alle dimensioni del tumore, alla presenza di metastasi e a cattiva prognosi.<sup>176</sup> Infine elevati livelli di espressione di miR-21 sono stati correlati a scarsa risposta alla terapia con 5FU,<sup>177</sup> e questo potrebbe essere spiegato dal fatto che miR-21, riducendo i livelli di MSH2, potrebbe inibire l'apoptosi 5FU-mediata.<sup>178</sup>

MiR-29 potrebbe rivestire un ruolo diagnostico: livelli significativamente più elevati di miR-29 sono stati riscontrati in soggetti affetti da malattia metastatica rispetto a soggetti con malattia localizzata con sensibilità e specificità del 75%.<sup>179</sup> Inoltre in un recente studio giapponese è stato dimostrato che miR-29 promuove la progressione neoplastica attraverso la regolazione di metalloproteinasi e di E-caderina e modula negativamente il gene KLF4, un noto oncosoppressore implicato nella cancerogenesi

colorettale. Elevati livelli di miR-29a associati a bassi profili di espressione di KLF4 correlano con la comparsa di metastasi ( $p=0.028$ ) e una prognosi negativa in pazienti con CRC.<sup>180</sup>

Numerosi studi hanno proposto miR-126 come importante fattore in grado di regolare l'angiogenesi. Elevati livelli di espressione tissutale sono stati correlati con incremento dell'attività della via di segnale di VEGF. Per questo miRNA è stato identificato sia un possibile ruolo prognostico che un ruolo predittivo in relazione al trattamento di prima linea con XELOX e più recentemente con bevacizumab e chemioterapia.<sup>181</sup> Inoltre anche i livelli circolanti di espressione sono stati correlati alla risposta al trattamento con bevacizumab.<sup>182</sup>

Per quanto riguarda il miR-141 studi condotti in popolazioni etniche diverse hanno evidenziato che i livelli di espressione di tale miRNA nel siero aumentano in relazione allo stadio di malattia.<sup>183</sup>

Un ulteriore studio asiatico ha mostrato come miR-221 possa essere un possibile biomaker diagnostico per l'identificazione di pazienti affetti da CRC rispetto ai soggetti sani. Inoltre, lo stesso studio ha evidenziato che elevati livelli di miR-221 sono associati ad una scarsa prognosi e ad alti livelli di espressione intratumorale di p53.<sup>184, 185</sup>

Un altro studio interessante ha dimostrato che i livelli plasmatici di miR-601 e miR-760 si riducono nei pazienti con CRC avanzato rispetto ai controlli sani. I livelli di espressione plasmatica di miR-601 e miR-760 possono contribuire alla diagnosi precoce con sensibilità - specificità di 69.2% - 72.4% e di 80.0% - 72.4% rispettivamente. La combinazione di questi marcatori associata al dosaggio del CEA permette di ottenere una sensibilità pari a 80.4% e una specificità pari a 65.5% nella diagnosi precoce di CRC al I e II stadio.<sup>186</sup>

In conclusione possiamo affermare che numerosi miRNA circolanti sono stati proposti come markers diagnostici, prognostici e/o predittivi nel CRC, tuttavia gli studi finora pubblicati hanno numerosi limiti metodologici: spesso sono stati condotti in un ristretto numero di pazienti, in popolazioni scarsamente selezionate, disomogenee non ben definite da un punto di vista clinico e terapeutico. Inoltre le metodiche impiegate per la quantificazione dell'espressione dei miRNA circolanti non sono

uniformi e non ci sono ad oggi studi robusti di validazione prospettica che supportino un qualche impiego clinico dei risultati sinora ottenuti.

## **Capitolo 4. Studio esplorativo sul ruolo dei miRNA circolanti in pazienti affetti da carcinoma colorettales metastatico trattati con regorafenib**

### **4.1 Introduzione e razionale**

Regorafenib è un inibitore chinasi multitarget e ad oggi costituisce l'unica opzione terapeutica registrata per i pazienti con mCRC refrattari alle terapie standard.<sup>108</sup> Considerando gli alti costi economici del trattamento, le tossicità talvolta anche gravi che esso può causare e la limitatezza del reale beneficio clinico, è fondamentale identificare al più presto dei fattori clinici o biomolecolari che siano in grado di definire a priori o precocemente pazienti responsivi o resistenti. Per considerazioni più estese sul meccanismo d'azione di regorafenib e i dati di efficacia e di sicurezza si rimanda al Capitolo 2.4.

Ad oggi, nessun fattore biomolecolare si è dimostrato particolarmente promettente nel predire il beneficio dal trattamento con regorafenib. Una strada ad oggi inesplorata è rappresentata dallo studio dei miRNA. Come descritto nel Capitolo 3 queste piccole molecole agiscono come regolatori post-trascrizionali dell'espressione genica e sono implicate nelle fasi precoci della cancerogenesi e nella progressione tumorale. Crescenti evidenze fanno emergere i miRNA come possibili markers diagnostici, prognostici e/o predittivi. Questi biomarcatori possono essere studiati sia nei tessuti che nei fluidi corporei, in particolare nel plasma.<sup>163</sup> I miRNA plasmatici sono considerati dei markers promettenti sia per il loro ruolo biologico che per motivi pratici. E' possibile infatti ottenerli con metodiche non invasive, sono sufficienti semplici prelievi di sangue e i livelli di espressione si mantengono stabili anche in condizioni di stoccaggio e movimentazione non ottimali perché sono contenuti all'interno di esosomi e micro-vescicole che ne impediscono la degradazione da parte delle RNasi endogene. Inoltre è possibile studiarne le variazioni precoci o tardive tramite prelievi eseguiti a time-point stabiliti e questo permette in linea teorica di avere informazioni sulla risposta al trattamento. In termini biologici queste molecole regolano numerosi target e, in particolare, possono influenzare in maniera sostanziale l'angiogenesi indotta dalla crescita neoplastica.

Numerosi miRNA circolanti sono stati identificati in pazienti affetti da CRC e il loro ruolo come markers diagnostici e prognostici è stato preliminarmente studiato. Più limitate sono le evidenze circa il possibile valore predittivo di risposta al trattamento

di tali molecole.<sup>159</sup> La Tabella 2 riassume le principali caratteristiche ed evidenze relative ai 10 miRNA circolanti più promettenti nel mCRC.

#### **4.2 Disegno e obiettivi dello studio**

Partendo da queste considerazioni, abbiamo valutato in maniera esplorativa in una coorte di pazienti con mCRC chemiorefrattari trattati con regorafenib secondo la vigente indicazione, il ruolo dei livelli di espressione di miRNA candidati (Tabella 2) nel predire l'outcome clinico in termini di attività ed efficacia del trattamento. I 10 miRNA testati sono stati definiti sulla base del loro già noto ruolo biologico, prognostico e diagnostico nel CRC.

Obiettivo primario dello studio è stato la correlazione tra le variazioni dei livelli di espressione al primo (G1) e al quindicesimo giorno (G15) di trattamento. I miRNA in cui è stata osservata una variazione significativa sono stati ulteriormente valutati in relazione alla risposta al trattamento.

## 4.3 Materiali e metodi

### 4.3.1 Selezione dei pazienti

Nel presente studio i pazienti seguiti presso il Polo Oncologico dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana sono stati ritenuti eleggibili sulla base delle seguenti caratteristiche:

- indicazione a trattamento con regorafenib; ovvero soggetti affetti da mCRC precedentemente trattati oppure non candidabili ai trattamenti standard disponibili (fluoropirimidine, oxaliplatino, irinotecano, anti-VEGF e anti-EGFR se *RAS* wild-type);
- disponibilità all'esecuzione di prelievi seriatati (vd. paragrafo successivo) e all'esecuzione delle analisi di espressione specificate;
- malattia valutabile secondo criteri RECIST 1.1;
- consenso informato scritto.

Non sono stati ritenuti eleggibili pazienti in cui il trattamento è stato interrotto precocemente entro 15 giorni dall'inizio della terapia.

Il trattamento con regorafenib è stato somministrato secondo la schedula tradizionale: 160 mg al giorno per 21 giorni ogni 28. I pazienti erano rivalutati per le tossicità con visita clinica e esami di laboratorio ogni 2 settimane come da indicazione registrativa. In caso di tossicità sono state apportate modifiche/interruzioni delle dosi seguendo le raccomandazioni precedentemente riportate (Capitolo 2.4).

L'attività del trattamento è stata valutata secondo i criteri RECISTv1.1, attraverso indagini TC eseguite ogni 8 settimane come da comune pratica clinica in questo setting. Le tossicità sono state riportate secondo i criteri NCI-CTCAEv4.0.

La PFS è stata definita come il tempo tra l'inizio della terapia e la progressione di malattia e/o il decesso per qualunque causa, l'OS invece è stata definita come il tempo trascorso tra l'inizio del trattamento ed il decesso.

I pazienti hanno fornito il loro consenso scritto all'utilizzo dei dati e all'effettuazione delle analisi secondo una procedura approvata dal Comitato Etico.

I biologi molecolari che si sono occupati delle analisi di espressione non erano a conoscenza dei dati clinici dei pazienti.

#### 4.3.2 Raccolta dei campioni plasmatici e estrazione dei miRNA

Le analisi di espressione dei miRNA sono state condotte nei laboratori dell'Unità di Oncogenomica (Core Research Laboratory – Istituto Toscano Tumori), con sede presso il CNR di Pisa.

I pazienti sono stati sottoposti a un prelievo di 6 ml sangue raccolto in una provetta contenente K<sub>3</sub>EDTA al G1 e al G15 del primo ciclo di trattamento.

Dopo il prelievo venoso i campioni sono stati immediatamente centrifugati a 1200xg per 10 minuti a temperatura ambiente. Il supernatante è stato raccolto in una provetta di plastica da 15 ml e capovolto 2-3 volte per rendere omogeneo il campione. A seguire è stato aliquotato in provette da 1.5 ml e centrifugato a 12000xg per 10 minuti a temperatura ambiente. Infine il plasma supernatante ottenuto con tale procedura è stato nuovamente aliquotato in provette da 1.5 ml DNasi e RNasi free per evitare la degradazione. I campioni adeguatamente etichettati sono stati conservati a -80°C fino al momento delle analisi biomolecolari.

I campioni prima dell'analisi dei miRNA sono stati sottoposti a un'analisi spettrofotometrica per escludere campioni in cui durante il prelievo si era verificata emolisi. Sono stati ritenuti emolizzati campioni con assorbanza 414 >0.15 rilevata con il sistema Nanodrop®.

L'estrazione dei miRNA è stata condotta con il kit miRNeasy® (Quiagen, Valencia) utilizzando 200 µL di plasma. Successivamente sono stati addizionati 5 µL di cel-miR-39, un miRNA di natura sintetica appartenente a *C. elegans*, al fine di ridurre la variabilità tra i diversi campioni sia durante l'isolamento di RNA che durante la retrotrascrizione e la RT-PCR. I miRNA sono stati processati e purificati secondo le istruzioni del kit e quindi diluiti in 30 µL di acqua RNasi free.

A questo punto 2 µL del prodotto dell'estrazione sono stati utilizzati per la retrotrascrizione eseguita con il kit miRScript® (Quiagen, Valencia) in modo tale da ottenere 20 µL di cDNA. Il prodotto della retrotrascrizione diluito 1:3 è stato utilizzato per la RT-PCR. Le reazioni di RT-PCR per la quantificazione di cel-miR-39, miR-17, miR-21, miR-29, miR-92, miR-126, miR-141, mir-221, miR-601e miR-760 sono state condotte in duplicato per ogni campione.

La RT-PCR è stata eseguita mediante l'utilizzo del sistema Applied Biosystems 7000 Sequence Detection. I valori del ciclo soglia (Ct) sono stati calcolati utilizzando lo stesso cut-off per ciascun saggio in modo da prevenire le variazioni tra le piastre, mentre i risultati sono stati analizzati con il software 1.4 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA).

I livelli di espressione nel plasma dei miRNA sono stati normalizzati secondo i valori del cel-miR-39 utilizzando il metodo  $2^{-Ct}$ .

#### **4.3.3 Considerazioni statistiche**

I livelli di espressione al G1 e al G15 di ciascun miRNA sono stati confrontati utilizzando il test di Wilcoxon:

- nei campioni di plasma appaiati nella popolazione generale;
- nei campioni di plasma appaiati nella popolazione di pazienti che ha beneficiato del trattamento (in cui si è osservata risposta o stabilità di malattia);
- nei campioni di plasma appaiati nella popolazione di pazienti che non ha beneficiato del trattamento (in cui si è osservata progressione di malattia).

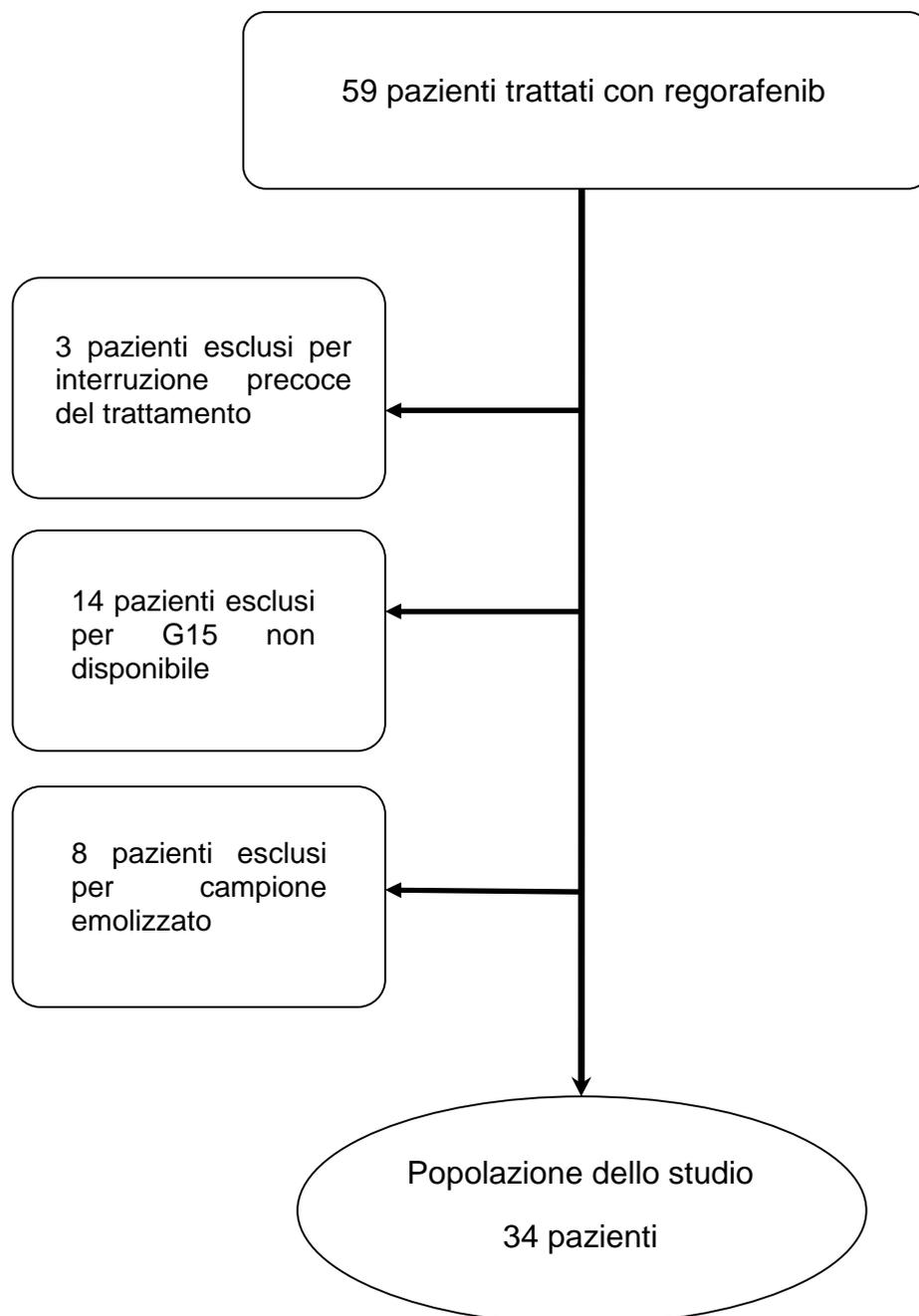
Per i miRNA ritenuti più promettenti sono state condotte delle analisi esplorative per correlare i livelli di espressione e la risposta al trattamento utilizzando il test di Fisher. Le analisi di sopravvivenza sono state condotte utilizzando il metodo di Kaplan-Meier e il log-rank test.

Per i miRNA ritenuti più promettenti sono stati calcolati i parametri standard di accuratezza di un test diagnostico (sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e negativo).

#### 4.4 Risultati

Nel periodo dello studio 59 pazienti sono stati trattati con regorafenib presso il Polo Oncologico dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana.

Tra questi, 3 hanno interrotto precocemente il trattamento per tossicità gravi (cutanea in 2 pazienti ed epatica in un paziente), in 14 casi i campioni al G15 non sono stati raccolti per motivi logistici, 8 campioni sono risultati positivi alla prova dell'emolisi; pertanto la popolazione finale oggetto di questo studio è stata di 34 pazienti (Figura sottostante).



Di seguito sono riportate le principali caratteristiche della popolazione in studio: 17 (50%) uomini e 17 (50%) donne; età mediana pari a 65 anni (range: 46-78); ECOG PS 0 al momento dell'inizio della terapia pari a 71%, PS 1 o 2 pari a 29%. In base allo score prognostico di Kohne, 3 (9%) pazienti sono stati definiti a basso rischio, 26 (76%) a rischio intermedio e 5 (15%) ad alto rischio. I pazienti hanno ricevuto una mediana di 3 cicli di terapia (range: 1-10). Durante il trattamento 27 pazienti (79%) hanno sviluppato tossicità di grado >2: sono stati osservati 7 (21%) episodi di ipertensione arteriosa, 4 (12%) di rash cutaneo, 8 (24%) di HFSSR, 3 (9%) di tossicità epatica con incremento delle transaminasi e 3 (9%) episodi di diarrea.

In termini di attività, 1 paziente (3%) ha ottenuto una risposta parziale e 16 (47%) una stabilizzazione di malattia per un tasso di controllo di malattia del 50%. In 17 pazienti (50%) si è verificata progressione di malattia alla prima rivalutazione. Ad un follow-up mediano di 9.1 mesi, la PFS mediana è risultata di 2.4 mesi e l'OS mediana di 6.5 mesi.

Nella popolazione in studio la correlazione tra i livelli plasmatici mediani dei miRNA circolanti analizzati ha evidenziato un incremento dell'espressione nei miR-601 ( $p=0.01$ ), miR-141 ( $p=0.04$ ) e miR-21 ( $p=0.06$ ) tra il G1 e il G15 come mostrato in Figura 1.

I miRNA che mostravano una variazione significativa tra G1 e G15 sono stati considerati "promettenti" ed inclusi nelle analisi successive.

Nonostante l'incremento di espressione osservato per il miR-21 nella popolazione generale, in 12 pazienti (35%) i livelli di espressione sono risultati ridotti come mostrato in Figura 2.

La correlazione tra i livelli mediani di miR-21 e la risposta al trattamento ha mostrato un incremento statisticamente significativo nei pazienti in cui si è osservata progressione di malattia (espressione media G1 vs G15= -5.81 vs -4.90,  $p=0.036$ ); mentre nei pazienti che hanno beneficiato del trattamento non si è osservata alcuna differenza significativa (espressione media G1 vs G15= -5.05 vs -4.76,  $p=0.953$ ).

Tra i 17 pazienti in cui si è osservata una progressione di malattia alla prima rivalutazione i livelli di espressione circolanti di miR-21 sono risultati ridotti in 3 pazienti (17%), mentre tra i 17 pazienti in cui si è osservata stabilità o risposta al trattamento i livelli di espressione circolanti di miR-21 sono risultati ridotti in 9 pazienti (53%) (Fisher exact test  $p=0.035$ ).

	<b>Progressione</b>	<b>Stabilità o Risposta</b>
<i>Incremento miR21</i>	14	8
<i>Riduzione miR21</i>	3	9
$p=0.035$		

Applicando una valutazione dei parametri standard di accuratezza di un test diagnostico predittivo l'incremento dei livelli di miR-21 al G15 è in grado di predire progressione di malattia con sensibilità pari a 82%, specificità pari a 53%, valore predittivo positivo 61% e valore predittivo negativo 75%.

La correlazione tra i livelli di espressione di miR-21 con i parametri di outcome ha mostrato che la PFS mediana nei pazienti in cui tale miRNA è incrementato è stata di 2.1 mesi vs 3.9 mesi nei pazienti in cui i livelli si sono ridotti (HR=1.89; 95%CI 0.92-4.14  $p=0.08$ ) (Figura 4). Risultati analoghi sono stati osservati in termini di OS mediana, 5.8 mesi vs 7.8 mesi nei due gruppi rispettivamente (HR=1.79; 95%CI 0.69-4.28  $p=0.25$ ) (Figura 5).

## 4.5 Discussione

Questo studio indica che i livelli di espressione di miR-21 si sono modificati precocemente e in maniera significativa nei campioni plasmatici di 34 pazienti sottoposti a trattamento con regorafenib. Tuttavia non in tutti i pazienti l'andamento è stato analogo, infatti analizzando i casi nella totalità è stato osservato un incremento dei livelli al 15° giorno di terapia, ma andando a correlare l'andamento nei singoli pazienti e la risposta al trattamento, abbiamo osservato che in 9 su 17 pazienti che hanno beneficiato del farmaco i livelli miR-21 si sono ridotti. La misurazione dei livelli di miR-21 ha mostrato una sensibilità dell'82% e un valore predittivo negativo del 75% nel predire il beneficio dal trattamento con regorafenib. Possiamo quindi affermare che la diminuzione precoce dell'espressione di miR-21 è associata all'andamento della malattia durante il trattamento con regorafenib valutato a 8 settimane.

Questi dati rappresentano un importante punto di partenza perché ad oggi non esiste nessun fattore clinico e/o biomolecolare correlato al beneficio della terapia con regorafenib<sup>147</sup>, se confermati prospetticamente, potranno essere utilizzati per selezionare a 2 settimane dall'inizio della terapia i pazienti in cui sospendere il trattamento per probabile inefficacia.

In questo studio per la prima volta sono state valutate le modificazioni precoci di un pool di miRNA circolanti candidati e il loro possibile ruolo predittivo di risposta durante il trattamento con regorafenib. Tuttavia non è la prima volta che viene indagato il possibile ruolo predittivo di risposta alla terapia di questi piccoli fattori circolanti, infatti un recente studio ha individuato nel miR-126 un fattore predittivo di risposta a chemioterapia di prima linea e bevacizumab. In particolare i campioni plasmatici di 68 pazienti trattati con XELOX e bevacizumab sono stati raccolti prima dell'inizio (G1) e dopo 21 giorni di trattamento (G21). Le variazioni dei livelli di espressione di miR-126 sono stati correlati con la risposta ed è emerso che nei pazienti che non beneficiavano del trattamento si osservava un incremento dei livelli di espressione, mentre l'andamento opposto si osservava nei pazienti che rispondevano alla terapia ( $p=0.002$ ).<sup>182</sup> Questi risultati rafforzano l'ipotesi che i miRNA possano essere utilizzati come fattori predittivi di risposta ai farmaci

antiangiogenici, pur trattandosi di un setting diverso e di uno studio preliminare ancora in attesa di conferma prospettica.

I risultati della nostra esperienza sono in linea sia con la funzione biologica di miR-21 che con gli studi precedentemente condotti che ne hanno identificato un possibile ruolo diagnostico e prognostico. In termini biologici è stato dimostrato che miR-21 è upregolato in numerose neoplasie solide tra cui il CRC e agisce come *oncomir* modulando l'espressione di numerosi geni tra cui *PTEN*, *timidilato sintetasi*, *TGF-*, *PDCD4*, *NF-kB* ed è coinvolto nella carcinogenesi influenzando la proliferazione l'apoptosi e la migrazione cellulare.<sup>187</sup> Inoltre i livelli di espressione circolanti correlano con lo stadio di malattia. Uno studio recente e ben condotto ha mostrato che i livelli di miR-21 erano più elevati in 186 soggetti affetti da CRC rispetto a 53 controlli sani ( $p < 0.001$ ) e che i livelli di espressione di miR-21 erano significativamente maggiori nei pazienti in stadio IV rispetto a quelli in stadio I e II, inoltre tali livelli di espressione andavano incontro ad una repentina riduzione dopo la resezione del tumore primitivo nei soggetti malati. Tali dati hanno portato a identificare questo marcatore come possibile fattore diagnostico con elevata sensibilità e specificità.<sup>188</sup>

Dal punto di vista metodologico alcuni elementi rafforzano i risultati del nostro studio. Tra questi troviamo ad esempio la selezione dei pazienti che è stata effettuata esclusivamente sulla base dell'indicazione a ricevere regorafenib. Tutti i pazienti che hanno ricevuto il trattamento sono stati prospetticamente arruolati nello studio e i dati clinici sono stati rigorosamente raccolti nel corso delle visite di controllo. Inoltre la popolazione in studio ha ricevuto solo un farmaco e pertanto non ci sono altri fattori, quali il trattamento con altri citotossici o con altri farmaci biologici che possano in qualche modo confondere i risultati ottenuti. In termini più tecnici possiamo ritenere affidabili le analisi sui livelli di espressione, infatti per ridurre la variabilità dei livelli di espressione dei miRNA condizionata dalle procedure di estrazione e RT-PCR è stato scelto come normalizzatore cel-miR-39, un miRNA di natura sintetica appartenente a *C. elegans*, assente nell'uomo ed ampiamente utilizzato in questo genere di studi.

Tra i limiti del nostro studio ci sono alcuni aspetti peculiari da considerare, infatti i miRNA circolanti possono essere rilasciati tramite cellule, esosomi o come miRNA liberi quindi è difficile stimare l'effetto che ciascuno di questi sistemi di rilascio ha sul

microambiente tumorale e sull'ospite in generale. E' stata dimostrata una notevole variabilità interindividuale dei livelli di miRNA circolanti non solo in relazione a processi neoplastici ma anche a numerose caratteristiche non modificabili dei soggetti quali età, sesso oppure eventi fisiologici come mestruazioni o gravidanza, ma anche fattori indipendenti dal soggetto, come la temperatura esterna e lo stress.<sup>163</sup> Queste considerazioni sottolineano l'importanza negli studi di espressione dei miRNA di avere una coorte di controllo che comprenda pazienti sani con caratteristiche simili alla popolazione in studio in termini di età, genere e razza.

Inoltre dal punto di vista biologico è necessario puntualizzare alcuni aspetti. Vista la coerenza dell'andamento progressivamente crescente dei livelli di espressione di questo miRNA nei diversi stadi della malattia, si potrebbe ipotizzare che le variazioni osservate nella nostra popolazione siano da attribuire all'andamento della malattia più che ad un'interazione diretta tra l'azione di regorafenib e miR-21. Infatti non ci sono al momento dati biologici che permettano di legare direttamente i bersagli di regorafenib e l'espressione di miR-21; inoltre la mancanza di un gruppo di pazienti con mCRC non trattati con regorafenib (gruppo di controllo) impedisce di valutare definitivamente il possibile ruolo predittivo di risposta. Mancano inoltre al momento analisi multivariate estese che permettano di stimare il peso di altri fattori prognostici già noti nel CRC.

Alcune considerazioni devono essere effettuate in relazione alla scelta della RT-PCR come metodo di quantificazione dei livelli di miRNA. Tale tecnica individua con elevata sensibilità e specificità solo miRNA già noti e scelti a priori. Pertanto questa metodica è stata ritenuta la più appropriata ai fini del presente studio che ha utilizzato un approccio "per miRNA candidati" ovvero scelti sulla base del loro già noto ruolo diagnostico, prognostico e talvolta anche predittivo di risposta al trattamento. Tuttavia, visto che nessun miRNA è mai stato correlato al trattamento con regorafenib e i dati esistenti seppure solidi e consistenti non sono stati confermati in set prospettici, avremmo potuto scegliere di utilizzare una tecnica "high throughput", quale ad esempio il microarray. In questo caso sarebbero stati identificati miRNA espressi in maniera significativamente diversa sia tra quelli noti che tra quelli non conosciuti. Però questa tecnica non avrebbe permesso di eseguire un'analisi quantitativa accurata e avrebbe incrementato il rischio di incorrere in bias statistici legati all'esecuzione di test multipli.

Riassumendo le considerazioni appena riportate, possiamo affermare che i nostri risultati evidenziano la necessità di indagare le possibili interazioni tra miR-21 e regorafenib in studi in vitro e in vivo. Inoltre una più approfondita conoscenza biologica potrebbe essere affiancata e di conseguenza completata anche da valutazioni cliniche quali l'utilizzo di tecniche di imaging che valutino precocemente la risposta al trattamento sia in termini dimensionali che morfologici.

In conclusione, seppure con i limiti sopracitati, si può ritenere che sulla base dei risultati ottenuti miR-21 possa rappresentare un potenziale biomarcatore precoce di beneficio clinico da regorafenib. Da un punto di vista metodologico, prima di poter formulare nuove ipotesi di lavoro questi risultati necessitano di essere replicati prospetticamente.

## **4.6 Conclusioni**

La selezione dei pazienti sulla base di fattori biomolecolari, oltre che clinici, rappresenta una delle più attuali sfide dell'oncologia moderna, resa ancor più pressante dall'introduzione e dalla rapida diffusione nella pratica quotidiana dei farmaci a bersaglio molecolare. La disponibilità di tali fattori di selezione costituirebbe in particolare un'arma di assoluto rilievo nel trattamento del mCRC. I miRNA circolanti rappresentano un possibile strumento utile nel selezionare precocemente i pazienti che beneficiano della terapia con regorafenib.

In linea generale i nostri risultati rappresentano un utile avanzamento nella conoscenza del mCRC e rafforzano l'importanza dell'approccio biomolecolare allo studio di questa malattia, nella quale abbiamo sempre più opzioni terapeutiche a disposizione e che ne rendono l'approccio ottimale sempre più complesso.

## Tabelle e figure

**Tabella 1. MiRNA circolanti con possibile ruolo diagnostico e/o prognostico nei pazienti con differenti neoplasie solide**

Tipo di neoplasia	miRNA	Ruolo diagnostico	Ruolo prognostico	Campione
<b>Polmone</b>	miR-20a, miR-24, miR-25, miR-145, miR-152, miR-199-5p, miR-221, miR-222, miR-223, miR-320	Si	No	Siero
<b>Mammella</b>	miR-200b	No	Si	Plasma
<b>Ovaio</b>	miR-221	Si	Si	Siero
<b>Cervice</b>	miR-218	Si	No	Siero
<b>Prostata</b>	miR-375, miR-141, miR-378, miR-409	Si	No	Siero
<b>Rene</b>	miR-378, miR-451	Si	No	Siero
<b>Colonretto</b>	miR-409-3p, miR-7, miR-93	Si	No	Plasma
<b>Stomaco</b>	miR-1, miR-20a, miR-27a, miR-34, miR-423	Si	No	Siero
<b>Fegato</b>	miR-122, miR-192, miR-21, miR-223, miR-26a, miR-27a, miR-801	Si	No	Plasma
<b>Pancreas</b>	miR-21	No	Si	Siero
<b>Esofago</b>	miR-10a, miR-22, miR-100, miR-148b, miR-223, miR-133a, miR-127-3p	Si	No	Siero
<b>Testa/collo</b>	miR-21	Si	No	Plasma
<b>Tiroide</b>	let-7e, miR-151-5p, miR-222	Si	No	Siero
<b>Encefalo</b>	miR-15b, miR-23a, miR-133a, miR-150, miR-197, miR-497, miR-548b-p	Si	No	Siero
<b>Melanoma</b>	miR-221	Si	Si	Siero

**Tabella 2. Caratteristiche e ruolo del 10 miRNA oggetto dello studio**

<b>miRNA</b>	<b>Geni Target</b>	<b>Sede Cromosomica</b>	<b>Livelli di espressione nel CRC</b>	<b>Ruolo Prognostico (SI/NO)</b>	<b>Ruolo Predittivo di risposta al trattamento (SI/NO)</b>	<b>Ruolo Diagnostico (SI/NO)</b>	<b>Ref.</b>
<b>miR-17</b>	<i>PTEN, DLC1, ZBP1</i>	13		NO	NO	SI	175
<b>miR-21</b>	<i>PTEN, PDCD, RECK, JAG1, BCL2, TIMP3, DKK2</i>	17		SI	SI	SI	188, 189
<b>miR-29</b>	<i>KLF4, DNMT3</i>	7		SI	NO	SI	190
<b>miR-34</b>	<i>WNT, MET, CDK4, CDK6, NOTCH1</i>	1		NO	NO	SI	191
<b>miR-92</b>	<i>PTEN, P63, RECK, DUSP10, ITGA5</i>	13		NO	NO	SI	192
<b>miR126</b>	<i>CXCR4, IRS-1, VEGF</i>	9		NO	SI	NO	193
<b>miR-141</b>	<i>ZEB1, ETS, FLT1</i>	12		SI	NO	SI	183
<b>miR-221</b>	<i>cKIT, CDKN1B, CDKN1C, BMF, BBC3/PUMA, PTEN, PI3K/AKT, PTP, TIMP3</i>	X		SI	NO	SI	194
<b>miR-601</b>	<i>CDHR1 EFNA4 JAK1 BCL2L HLA-F-</i>	9		NO	NO	SI	186
<b>miR-760</b>	<i>EPB41L3 TOX4 SHMT2 PUM1-</i>	1		NO	NO	SI	186

**Tabella 3. Caratteristiche cliniche dei pazienti**

Caratteristiche		N=34 (%)
Sesso	Femmine	17 (50)
	Maschi	17 (50)
Età	Mediana	65
	Range	46-78
ECOG Performance status	0	24 (71)
	1-2	10 (29)
Sede del tumore primitivo	Colon destro	13 (38)
	Colon sinistro	14 (41)
	Retto	7 (21)
Stato mutazionale	RAS mut	23 (68)
	BRAF mut	2 (6)
	wild type	9 (26)
Presentazione delle metastasi	Sincrona	24 (71)
	Metacrona	10 (29)
Sedi di malattia metastatica	1	4 (12)
	>1	30 (88)
Numero di linee di terapie precedenti	1-2	14 (41)
	3	11 (32)
	4	9 (27)
Tempo tra diagnosi di malattia metastatica e trattamento con regorafenib	<18 mesi	5 (15)
	18 mesi	29 (85)
Score prognostico di Köhne	Rischio elevato	3 (9)
	Rischio intermedio	26 (76)
	Rischio basso	5 (15)

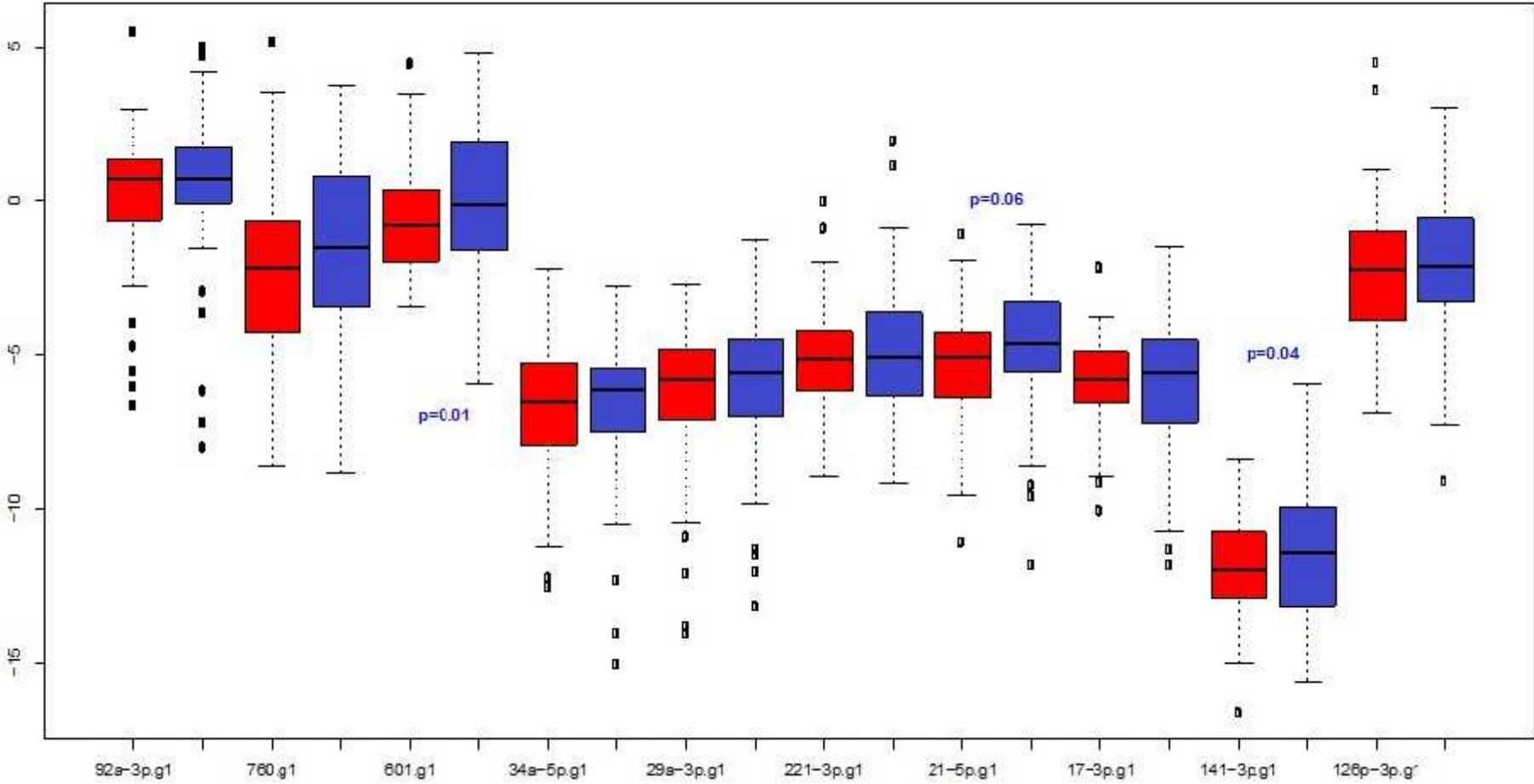
**Tabella 4. Parametri di outcome dei 34 pazienti sottoposti allo studio.**

Parametri di outcome		
<i>PFS mediana</i>		2.4 mesi
<i>OS mediana</i>		6.5 mesi
<i>Risposta</i>	Risposta parziale	1 (3%)
	Stabilità di malattia	16 (47%)
	Progressione di malattia	17 (50%)

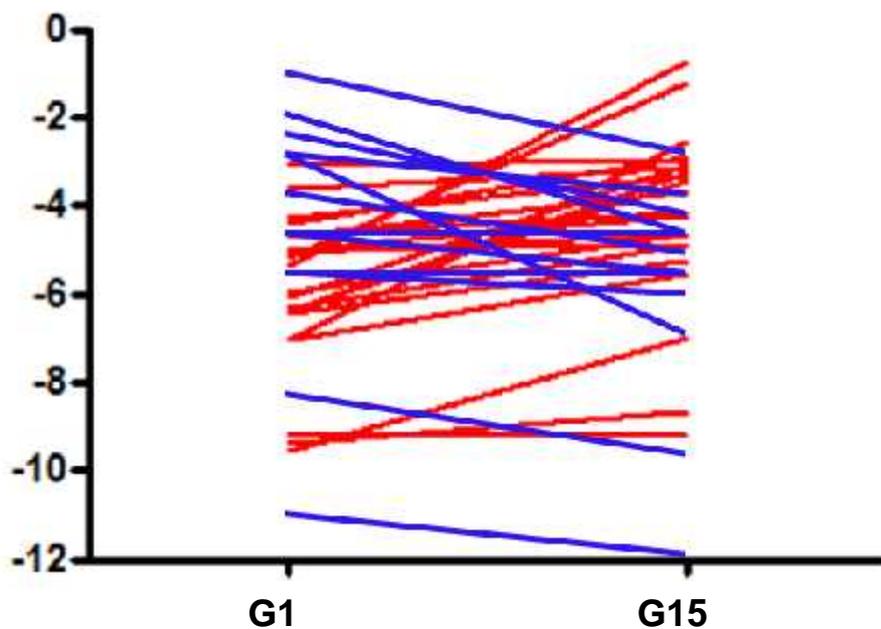
**Tabella 5. Tolleranza e tossicità di grado>2 correlate al trattamento.**

<b>Compliance al trattamento e tossicità</b>	<b>N (%)</b>
<i>Riduzioni di dose</i>	17 (50)
<i>Interruzione per tossicità</i>	5 (15)
<i>Tossicità di grado &gt;2</i>	27 (79)
<i>Iperensione</i>	7 (21)
<i>Rash cutaneo</i>	4 (12)
<i>Sindrome mano-piede</i>	8 (24)
<i>Mucosite</i>	1 (3)
<i>Diarrea</i>	3 (9)
<i>Iperbilirubinemia</i>	2 (6)
<i>Incremento ALT/AST</i>	3 (9)
<i>Altre tossicità</i>	15 (44)

Figura 1. Grafico riassuntivo della correlazione tra i livelli plasmatici mediani dei miRNA circolanti analizzati nella popolazione oggetto dello studio.



**Figura 2. Variazioni dei livelli di espressione di miR-21 tra G1 e G15 nei 34 pazienti in studio. In blu vediamo i pazienti in cui i livelli di miR-21 sono scesi al G15; in rosso i pazienti in cui i livelli di miR-21 sono saliti al G15.**



**Figura 3. Variazioni dei livelli di espressione di miR-21 tra G1 e G15 in pazienti con successiva risposta o stabilizzazione di malattia vs pazienti successivamente andati incontro a progressione**

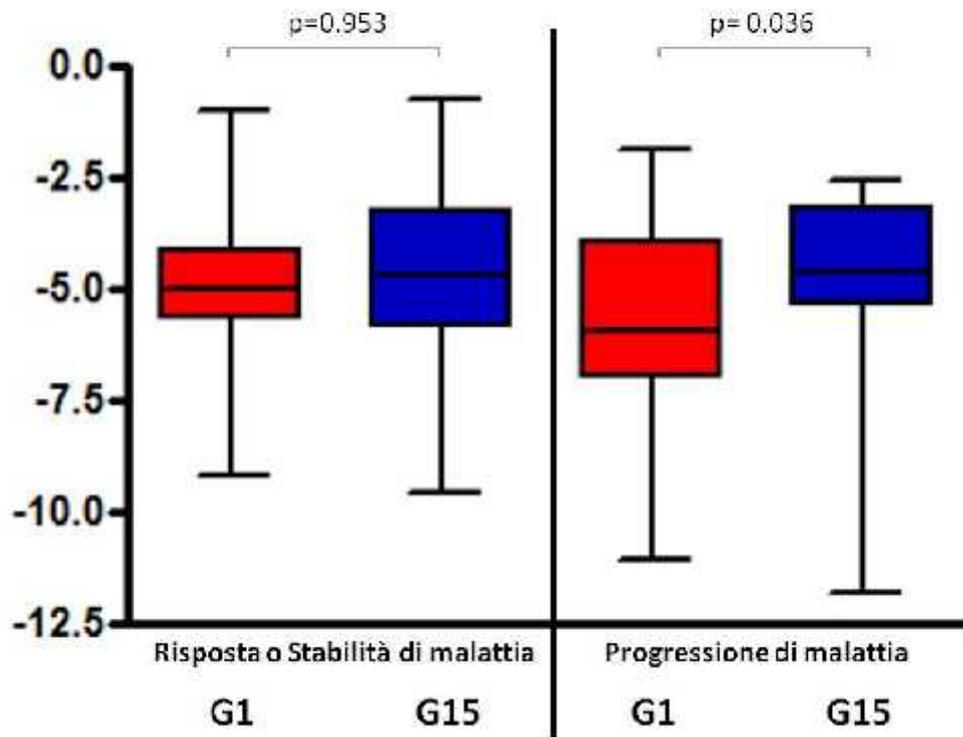


Figura 4. PFS in relazione alle variazioni dei livelli di espressione di miR-21

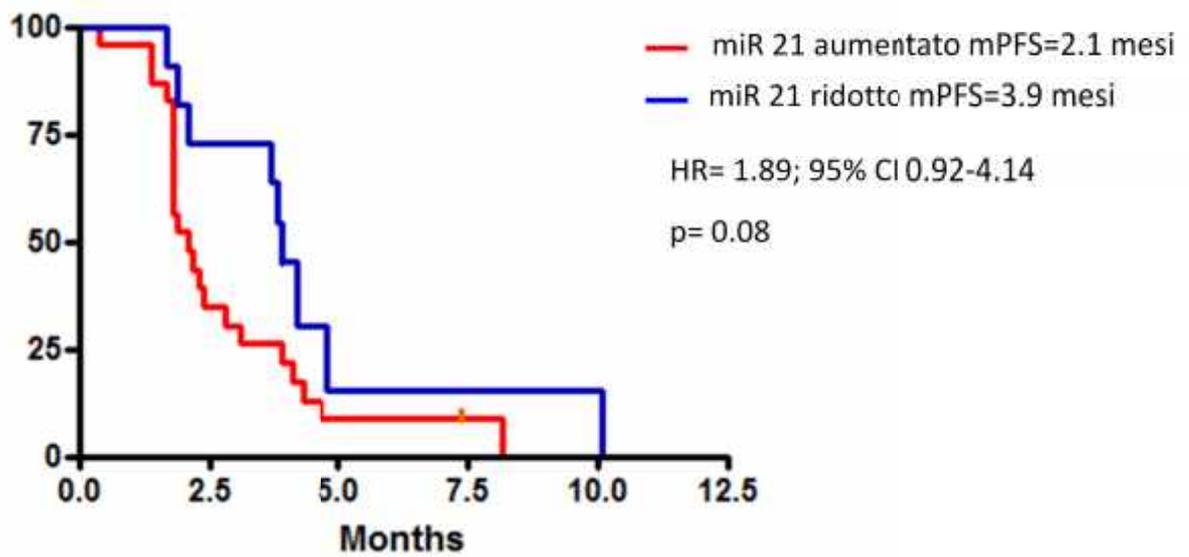
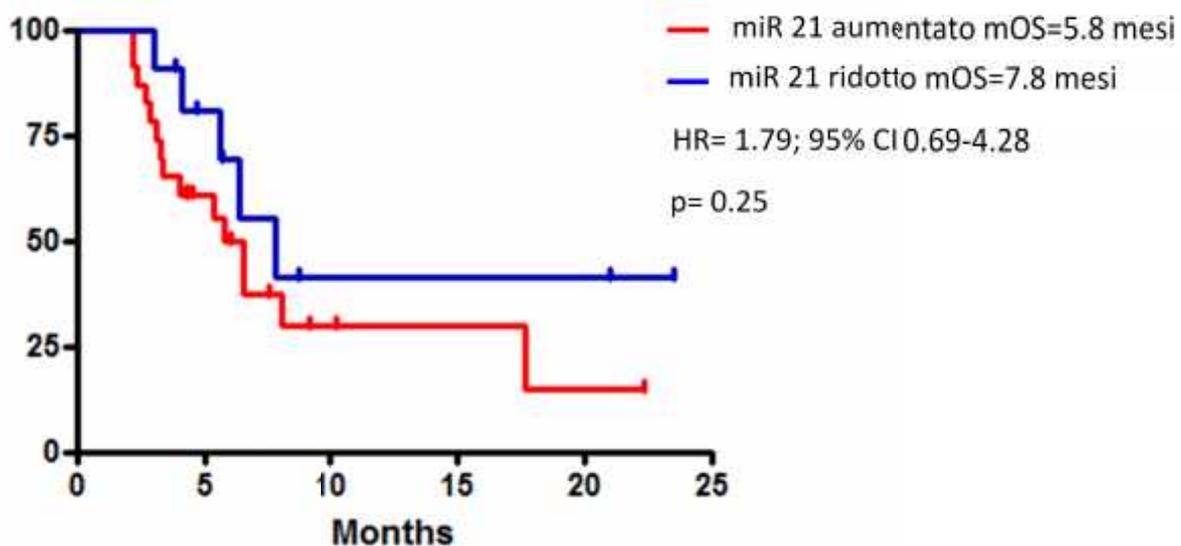


Figura 5. OS in relazione alle variazioni dei livelli di espressione di miR-21



## Bibliografia

1. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2010; **19**(8): 1893-907.
2. Tarraga Lopez PJ, Albero JS, Rodriguez-Montes JA. Primary and secondary prevention of colorectal cancer. *Clin Med Insights Gastroenterol*. 2014; **7**: 33-46.
3. Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014; **64**(2): 104-17.
4. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2013; **49**(6): 1374-403.
5. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin*. 2009; **59**(6): 366-78.
6. Albano JD, Ward E, Jemal A, Anderson R, Cokkinides VE, Murray T, et al. Cancer mortality in the United States by education level and race. *Journal of the National Cancer Institute*. 2007; **99**(18): 1384-94.
7. Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, Capocaccia R, et al. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *The Lancet Oncology*. 2008; **9**(8): 730-56.
8. Howlader N NA, Krapcho M, et al.eds. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010. Bethesda, MD: National Cancer Institute;2013. 2013.
9. Bach PB, Schrag D, Brawley OW, Galaznik A, Yakren S, Begg CB. Survival of blacks and whites after a cancer diagnosis. *Jama*. 2002; **287**(16): 2106-13.
10. Surveillance E, and EndResults (SEER) Program. SEER\*StatDatabase:Incidence-SEER 9 Regs Public Use,Nov. 2011 Sub (1973-2010)-Linked toCounty Attributes-Total US, 1969-2011Counties. Bethesda, MD: National CancerInstitute, Division of Cancer Control andPopulation Sciences, Surveillance ResearchProgram, Cancer Statistics Branch; 2013. 2013.
11. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Goodman PJ, et al. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med*. 1990; **322**(6): 352-8.
12. Curley SA, Izzo F, Delrio P, Ellis LM, Granchi J, Vallone P, et al. Radiofrequency ablation of unresectable primary and metastatic hepatic malignancies: results in 123 patients. *Annals of surgery*. 1999; **230**(1): 1-8.
13. Murphy G, Devesa SS, Cross AJ, Inskip PD, McGlynn KA, Cook MB. Sex disparities in colorectal cancer incidence by anatomic subsite, race and age. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2011; **128**(7): 1668-75.
14. Nawa T, Kato J, Kawamoto H, Okada H, Yamamoto H, Kohno H, et al. Differences between right- and left-sided colon cancer in patient characteristics, cancer morphology and histology. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2008; **23**(3): 418-23.
15. Surveillance E, and End Results(SEER) Program SEER\*Stat Database: NorthAmerican Association of Central CancerRegistries (NAACCR) Incidence-CiNA AnalyticFile, 1995-2010, for Expanded Races,custom file with county, ACS Facts & Figuresprojection project, North American Associationof Central Cancer Registries. Bethesda,MD:National Cancer Institute, Division ofCancer Control and Population Sciences,Surveillance Research Program, Cancer Statistics, 2013 B. 2013.
16. 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.
17. Chao A, Thun MJ, Connell CJ, McCullough ML, Jacobs EJ, Flanders WD, et al. Meat consumption and risk of colorectal cancer. *Jama*. 2005; **293**(2): 172-82.
18. Paskett ED, Reeves KW, Rohan TE, Allison MA, Williams CD, Messina CR, et al. Association between cigarette smoking and colorectal cancer in the Women's Health Initiative. *Journal of the National Cancer Institute*. 2007; **99**(22): 1729-35.
19. Hooker CM, Gallicchio L, Genkinger JM, Comstock GW, Alberg AJ. A prospective cohort study of rectal cancer risk in relation to active cigarette smoking and passive smoke exposure. *Annals of epidemiology*. 2008; **18**(1): 28-35.
20. 2002 IWGotEoC-PAWcapalSP. 2002.

21. Moghaddam AA, Woodward M, Huxley R. Obesity and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of 31 studies with 70,000 events. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 2007; **16**(12): 2533-47.
22. Pisani P. Hyper-insulinaemia and cancer, meta-analyses of epidemiological studies. *Archives of physiology and biochemistry.* 2008; **114**(1): 63-70.
23. Lieberman DA, Prindiville S, Weiss DG, Willett W, Group VACS. Risk factors for advanced colonic neoplasia and hyperplastic polyps in asymptomatic individuals. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 2003; **290**(22): 2959-67.
24. Imperiale TF. Aspirin and the prevention of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2003; **348**(10): 879-80.
25. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet.* 2014; **383**(9927): 1490-502.
26. Vasen HF. Review article: The Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *Alimentary pharmacology & therapeutics.* 2007; **26 Suppl 2**: 113-26.
27. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science.* 1993; **260**(5109): 816-9.
28. Bertagnolli MM, Mahmoud NN, Daly JM. Surgical aspects of colorectal carcinoma. *Hematology/oncology clinics of North America.* 1997; **11**(4): 655-77.
29. Sinicrpe FA, Sargent DJ. Clinical implications of microsatellite instability in sporadic colon cancers. *Current opinion in oncology.* 2009; **21**(4): 369-73.
30. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990; **61**(5): 759-67.
31. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews.* 2001; **22**(2): 153-83.
32. Taketo MM, Takaku K. Gastro-intestinal tumorigenesis in Smad4 mutant mice. *Cytokine & growth factor reviews.* 2000; **11**(1-2): 147-57.
33. colon-retto LgATd. 2012.
34. <http://www.aiom.it/area+pubblica/area+medica/prodotti+scientifici/linee+guida/1%2C333%2C1%2C>. 2014.
35. Burch JA, Soares-Weiser K, St John DJ, Duffy S, Smith S, Kleijnen J, et al. Diagnostic accuracy of faecal occult blood tests used in screening for colorectal cancer: a systematic review. *Journal of medical screening.* 2007; **14**(3): 132-7.
36. Richter S. Fecal DNA screening in colorectal cancer. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie.* 2008; **22**(7): 631-3.
37. Atkin WS, Cook CF, Cuzick J, Edwards R, Northover JM, Wardle J, et al. Single flexible sigmoidoscopy screening to prevent colorectal cancer: baseline findings of a UK multicentre randomised trial. *Lancet.* 2002; **359**(9314): 1291-300.
38. Winawer SJ, Zauber AG, O'Brien MJ, Ho MN, Gottlieb L, Sternberg SS, et al. Randomized comparison of surveillance intervals after colonoscopic removal of newly diagnosed adenomatous polyps. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med.* 1993; **328**(13): 901-6.
39. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Andrews KS, Brooks D, Bond J, 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. *Gastroenterology.* 2008; **134**(5): 1570-95.
40. Valori R, Rey JF, Atkin WS, Bretthauer M, Senore C, Hoff G, et al. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. First Edition--Quality assurance in endoscopy in colorectal cancer screening and diagnosis. *Endoscopy.* 2012; **44 Suppl 3**: SE88-105.
41. European Colorectal Cancer Screening Guidelines Working G, von Karsa L, Patnick J, Segnan N, Atkin W, Halloran S, et al. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis: overview and introduction to the full supplement publication. *Endoscopy.* 2013; **45**(1): 51-9.
42. Lansdorp-Vogelaar I, von Karsa L, International Agency for Research on C. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. First Edition--Introduction. *Endoscopy.* 2012; **44 Suppl 3**: SE15-30.
43. Barrow P, Khan M, Lalloo F, Evans DG, Hill J. Systematic review of the impact of registration and screening on colorectal cancer incidence and mortality in familial adenomatous polyposis and Lynch syndrome. *The British journal of surgery.* 2013; **100**(13): 1719-31.
44. Jass JR, 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. 1989.

45. Hedinger C, Williams ED, Sobin LH. The WHO histological classification of thyroid tumors: a commentary on the second edition. *Cancer*. 1989; **63**(5): 908-11.
46. Gagliardi G, Stepniewska KA, Hershman MJ, Hawley PR, Talbot IC. New grade-related prognostic variable for rectal cancer. *The British journal of surgery*. 1995; **82**(5): 599-602.
47. Abeloff MD, *Abeloff's clinical oncology*. 4th ed. 2008, Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier. 2008.
48. Dionigi -Chirurgia BteCg-CsEE-M, Edizione: V 9/2011.
49. Kasper B, Fauci, Hauser, Longo, Jamerson. *Harrison-Principi di medicina interna 16 edizione Editore:McGraw-Hill, 2007*
50. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *Lancet*. 2010; **375**(9719): 1030-47.
51. Wittekind C, Oberschmid B. [TNM classification of malignant tumors 2010: General aspects and amendments in the general section]. *Der Pathologe*. 2010; **31**(5): 333-4, 6-8.
52. Byers T, Levin B, Rothenberger D, Dodd GD, Smith RA. American Cancer Society guidelines for screening and surveillance for early detection of colorectal polyps and cancer: update 1997. American Cancer Society Detection and Treatment Advisory Group on Colorectal Cancer. *CA Cancer J Clin*. 1997; **47**(3): 154-60.
53. Sosna J, Sella T, Sy O, Lavin PT, Eliahou R, Fraifeld S, et al. Critical analysis of the performance of double-contrast barium enema for detecting colorectal polyps > or = 6 mm in the era of CT colonography. *AJR American journal of roentgenology*. 2008; **190**(2): 374-85.
54. Copel L, Sosna J, Kruskal JB, Raptopoulos V, Farrell RJ, Morrin MM. CT colonography in 546 patients with incomplete colonoscopy. *Radiology*. 2007; **244**(2): 471-8.
55. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012; **23**(10): 2479-516.
56. Brown G, Radcliffe AG, Newcombe RG, Dallimore NS, Bourne MW, Williams GT. Preoperative assessment of prognostic factors in rectal cancer using high-resolution magnetic resonance imaging. *The British journal of surgery*. 2003; **90**(3): 355-64.
57. Niekel MC, Bipat S, Stoker J. Diagnostic imaging of colorectal liver metastases with CT, MR imaging, FDG PET, and/or FDG PET/CT: a meta-analysis of prospective studies including patients who have not previously undergone treatment. *Radiology*. 2010; **257**(3): 674-84.
58. Yada H, Sawai K, Taniguchi H, Hoshima M, Katoh M, Takahashi T. Analysis of vascular anatomy and lymph node metastases warrants radical segmental bowel resection for colon cancer. *World journal of surgery*. 1997; **21**(1): 109-15.
59. MA CJ-PcfcgihncchttcR-B.
60. Herfarth C, Runkel N. [Surgical standards in primary colon cancer]. *Der Chirurg; Zeitschrift fur alle Gebiete der operativen Medizin*. 1994; **65**(6): 514-23.
61. Touloumtzidis A, Sostmann B, Hilgers N, Renter MA, Kuhn P, Goretzki PE, et al. Functional long-term results after rectal cancer surgery--technique of the athermal mesorectal excision. *International journal of colorectal disease*. 2014; **29**(3): 285-92.
62. Heald RJ, Moran BJ, Ryall RD, Sexton R, MacFarlane JK. Rectal cancer: the Basingstoke experience of total mesorectal excision, 1978-1997. *Archives of surgery*. 1998; **133**(8): 894-9.
63. Moore HG, Riedel E, Minsky BD, Saltz L, Paty P, Wong D, et al. Adequacy of 1-cm distal margin after restorative rectal cancer resection with sharp mesorectal excision and preoperative combined-modality therapy. *Annals of surgical oncology*. 2003; **10**(1): 80-5.
64. Andreola S, Leo E, Belli F, Bonfanti G, Sirizzotti G, Greco P, et al. Adenocarcinoma of the lower third of the rectum surgically treated with a <10-MM distal clearance: preliminary results in 35 N0 patients. *Annals of surgical oncology*. 2001; **8**(7): 611-5.
65. Nagtegaal ID, Quirke P. What is the role for the circumferential margin in the modern treatment of rectal cancer? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008; **26**(2): 303-12.
66. Enker WE. Total mesorectal excision--the new golden standard of surgery for rectal cancer. *Annals of medicine*. 1997; **29**(2): 127-33.
67. [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/colon.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon.pdf). 2015.
68. Wolmark N, Fisher B, Rockette H, Redmond C, Wickerham DL, Fisher ER, et al. Postoperative adjuvant chemotherapy or BCG for colon cancer: results from NSABP protocol C-01. *Journal of the National Cancer Institute*. 1988; **80**(1): 30-6.

69. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen CM, et al. Fluorouracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: a final report. *Annals of internal medicine*. 1995; **122**(5): 321-6.
70. Poplin EA, Benedetti JK, Estes NC, Haller DG, Mayer RJ, Goldberg RM, 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005; **23**(9): 1819-25.
71. Price TJ, Segelov E, Burge M, Haller DG, Ackland SP, Tebbutt NC, et al. Current opinion on optimal treatment for colorectal cancer. *Expert review of anticancer therapy*. 2013; **13**(5): 597-611.
72. Twelves C, Wong A, Nowacki MP, Abt M, Burris H, 3rd, Carrato A, et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med*. 2005; **352**(26): 2696-704.
73. Andre T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009; **27**(19): 3109-16.
74. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med*. 2004; **350**(23): 2343-51.
75. Kuebler JP, Wieand HS, O'Connell MJ, Smith RE, Colangelo LH, Yothers G, et al. Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP C-07. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007; **25**(16): 2198-204.
76. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011; **29**(11): 1465-71.
77. Cortezoso L, Lopez-Fernandez LA. Pharmacogenetic markers of toxicity for chemotherapy in colorectal cancer patients. *Pharmacogenomics*. 2012; **13**(10): 1173-91.
78. Amstutz U, Froehlich TK, Largiader CR. Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity. *Pharmacogenomics*. 2011; **12**(9): 1321-36.
79. Saltz LB, Niedzwiecki D, Hollis D, Goldberg RM, Hantel A, Thomas JP, et al. Irinotecan fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: results of CALGB 89803. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007; **25**(23): 3456-61.
80. Van Cutsem E, Labianca R, Bodoky G, Barone C, Aranda E, Nordlinger B, et al. Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC-3. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009; **27**(19): 3117-25.
81. de Gramont A, Van Cutsem E, Schmoll HJ, Tabernero J, Clarke S, Moore MJ, et al. Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy as adjuvant treatment for colon cancer (AVANT): a phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet Oncology*. 2012; **13**(12): 1225-33.
82. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, Sharif S, Petrelli NJ, Colangelo LH, et al. Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011; **29**(1): 11-6.
83. Alberts SR, Sargent DJ, Nair S, Mahoney MR, Mooney M, Thibodeau SN, et al. Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial. *Jama*. 2012; **307**(13): 1383-93.
84. Tsai WS, Hsieh PS, Yeh CY, Chiang JM, Tang R, Chen JS, et al. Impact of chemotherapy-related prognostic factors on long-term survival in patients with stage III colorectal cancer after curative resection. *International journal of clinical oncology*. 2013; **18**(2): 242-53.
85. Sobrero A, Kerr D, Glimelius B, Van Cutsem E, Milano G, Pritchard DM, et al. New directions in the treatment of colorectal cancer: a look to the future. *European journal of cancer*. 2000; **36**(5): 559-66.
86. 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. The New England journal of medicine*. 2000; **343**(13): 905-14.
87. Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, Le Bail N, Faggiuolo R, Focan C, et al. Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2000; **18**(1): 136-47.

88. Falcone A, Masi G, Allegrini G, Danesi R, Pfanner E, Brunetti IM, et al. Biweekly chemotherapy with oxaliplatin, irinotecan, infusional Fluorouracil, and leucovorin: a pilot study in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002; **20**(19): 4006-14.
89. Van Cutsem E, Twelves C, Cassidy J, Allman D, Bajetta E, Boyer M, et al. Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001; **19**(21): 4097-106.
90. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet*. 2000; **355**(9209): 1041-7.
91. Colucci G, Gebbia V, Paoletti G, Giuliani F, Caruso M, Gebbia N, 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005; **23**(22): 4866-75.
92. Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004; **22**(2): 229-37.
93. Arkenau HT, Arnold D, Cassidy J, Diaz-Rubio E, Douillard JY, Hochster H, et al. Efficacy of oxaliplatin plus capecitabine or infusional fluorouracil/leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: a pooled analysis of randomized trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008; **26**(36): 5910-7.
94. Kohne CH, De Greve J, Hartmann JT, Lang I, Vergauwe P, Becker K, et al. Irinotecan combined with infusional 5-fluorouracil/folinic acid or capecitabine plus celecoxib or placebo in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer. EORTC study 40015. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2008; **19**(5): 920-6.
95. Fuchs CS, Marshall J, Mitchell E, Wierzbicki R, Ganju V, Jeffery M, et al. Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results from the BICC-C Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007; **25**(30): 4779-86.
96. Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004; **22**(2): 229-37.
97. Grothey A, Sargent D, Goldberg RM, Schmoll HJ. Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004; **22**(7): 1209-14.
98. Church TR. Screening for colorectal cancer--which strategy is the best? *Journal of the National Cancer Institute*. 2011; **103**(17): 1282-3.
99. Fischel JL, Rostagno P, Formento P, Dubreuil A, Etienne MC, Milano G. Ternary combination of irinotecan, fluorouracil-folinic acid and oxaliplatin: results on human colon cancer cell lines. *British journal of cancer*. 2001; **84**(4): 579-85.
100. Falcone A, Allegrini G, Antonuzzo A, Brunetti I, Pfanner E, Lencioni M, et al. Infusions of fluorouracil and leucovorin: effects of the timing and semi-intermittency of drug delivery. *Oncology*. 1999; **57**(3): 195-201.
101. Falcone A, Di Paolo A, Masi G, Allegrini G, Danesi R, Lencioni M, et al. Sequence effect of irinotecan and fluorouracil treatment on pharmacokinetics and toxicity in chemotherapy-naive metastatic colorectal cancer patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001; **19**(15): 3456-62.
102. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, et al. 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007; **25**(13): 1670-6.
103. Souglakos J, Androulakis N, Syrigos K, Polyzos A, Ziras N, Athanasiadis A, et al. FOLFOXIRI (folinic acid, 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan) vs FOLFIRI (folinic acid, 5-fluorouracil and irinotecan) as first-line treatment in metastatic colorectal cancer (MCC): a multicentre randomised phase III trial from the Hellenic Oncology Research Group (HORG). *British journal of cancer*. 2006; **94**(6): 798-805.

104. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2004; **350**(23): 2335-42.
105. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2004; **351**(4): 337-45.
106. Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, Prenen H, Prausova J, Macarulla T, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012; **30**(28): 3499-506.
107. Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007; **25**(13): 1658-64.
108. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2013; **381**(9863): 303-12.
109. Masi G, Salvatore L, Boni L, Loupakis F, Cremolini C, Fornaro L, et al. Continuation or reintroduction of bevacizumab beyond progression to first-line therapy in metastatic colorectal cancer: final results of the randomized BEBYP trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2015.
110. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2009; **360**(14): 1408-17.
111. Fidler IJ, Ellis LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell*. 1994; **79**(2): 185-8.
112. Tille JC, Wang X, Lipson KE, McMahon G, Ferrara N, Zhu Z, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 signaling mediates VEGF-C(deltaNdeltaC)- and VEGF-A-induced angiogenesis in vitro. *Experimental cell research*. 2003; **285**(2): 286-98.
113. Margolin K, Gordon MS, Holmgren E, Gaudreault J, Novotny W, Fyfe G, et al. Phase Ib trial of intravenous recombinant humanized monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor in combination with chemotherapy in patients with advanced cancer: pharmacologic and long-term safety data. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001; **19**(3): 851-6.
114. Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nature medicine*. 2001; **7**(9): 987-9.
115. Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, et al. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nature medicine*. 2004; **10**(2): 145-7.
116. Puthillath A, Patel A, Fakhri MG. Targeted therapies in the management of colorectal carcinoma: role of bevacizumab. *OncoTargets and therapy*. 2009; **2**: 1-15.
117. Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008; **26**(12): 2013-9.
118. Kabbinavar FF, Schulz J, McCleod M, Patel T, Hamm JT, Hecht JR, et al. Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005; **23**(16): 3697-705.
119. Cunningham D, Lang I, Marcuello E, Lorusso V, Ocivirk J, Shin DB, et al. Bevacizumab plus capecitabine versus capecitabine alone in elderly patients with previously untreated metastatic colorectal cancer (AVEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2013; **14**(11): 1077-85.
120. Masi G, Loupakis F, Salvatore L, Fornaro L, Cremolini C, Cupini S, et al. Bevacizumab with FOLFOXIRI (irinotecan, oxaliplatin, fluorouracil, and folinate) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2010; **11**(9): 845-52.
121. Loupakis F, Cremolini C, Masi G, Lonardi S, Zagonel V, Salvatore L, et al. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2014; **371**(17): 1609-18.

122. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007; **25**(12): 1539-44.
123. Bennouna J, Sastre J, Arnold D, Osterlund P, Greil R, Van Cutsem E, et al. Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer (ML18147): a randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2013; **14**(1): 29-37.
124. Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, Prenen H, Prausova J, Macarulla T, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012; **30**(28): 3499-506.
125. RAISE:A Randomized D-b, Multicenter Phase III Study of Irinotecan, Folinic Acid, and 5-Fluorouracil (FOLFIRI) Plus Ramucirumab or Placebo in Patients with Metastatic Colorectal Carcinoma Progression During or Following First-line Combination Therapy with Bevacizumab, Oxaliplatin, and a Fluoropyrimidine Josep Tabernero\*, Allen Lee Cohn, Radka Obermannova, Gyorgy Bodoky. 2015.
126. Porebska I, Harlozinska A, Bojarowski T. Expression of the tyrosine kinase activity growth factor receptors (EGFR, ERB B2, ERB B3) in colorectal adenocarcinomas and adenomas. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2000; **21**(2): 105-15.
127. Loupakis F, Antoniotti C, Cremolini C, Zhang W, Yang D, Wakatsuki T, et al. Prospective study of EGFR intron 1 (CA)n repeats variants as predictors of benefit from cetuximab and irinotecan in chemo-refractory metastatic colorectal cancer (mCRC) patients. *The pharmacogenomics journal*. 2014; **14**(4): 322-7.
128. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, 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. *The Lancet Oncology*. 2010; **11**(8): 753-62.
129. Douillard JY, Rong A, Sidhu R. RAS mutations in colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2013; **369**(22): 2159-60.
130. Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR, Steele RJ. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut*. 2005; **54**(9): 1283-6.
131. Van Cutsem E, Lenz HJ, Kohne CH, Heinemann V, Tejpar S, Melezinek I, et al. Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Plus Cetuximab Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015; **33**(7): 692-700.
132. Van Cutsem E, Lenz HJ, Kohne CH, Heinemann V, Tejpar S, Melezinek I, et al. Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Plus Cetuximab Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015.
133. Wolmark N. Adjuvant therapy for colorectal cancer: the NSABP clinical trials. *Advances in experimental medicine and biology*. 1988; **244**: 261-6.
134. Folprecht G, Hamann S, Schutte K, Trarbach T, Stoehlmacher-Williams J, Ehninger G. Dose escalating study of cetuximab and 5-FU/folinic acid (FA)/oxaliplatin/irinotecan (FOLFOXIRI) in first line therapy of patients with metastatic colorectal cancer. *BMC cancer*. 2014; **14**: 521.
135. Fornaro L, Lonardi S, Masi G, Loupakis F, Bergamo F, Salvatore L, et al. FOLFOXIRI in combination with panitumumab as first-line treatment in quadruple wild-type (KRAS, NRAS, HRAS, BRAF) metastatic colorectal cancer patients: a phase II trial by the Gruppo Oncologico Nord Ovest (GONO). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013; **24**(8): 2062-7.
136. Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, et al. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999; **96**(4): 1603-8.
137. Sobrero AF, Maurel J, Fehrenbacher L, Scheithauer W, Abubakr YA, Lutz MP, et al. EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008; **26**(14): 2311-9.
138. Peeters M, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, Hotko Y, et al. Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010; **28**(31): 4706-13.

139. Seymour MT, Brown SR, Middleton G, Maughan T, Richman S, Gwyther S, et al. Panitumumab and irinotecan versus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type, fluorouracil-resistant advanced colorectal cancer (PICCOLO): a prospectively stratified randomised trial. *The Lancet Oncology*. 2013; **14**(8): 749-59.
140. Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, Al-Batran SE, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2014; **15**(10): 1065-75.
141. Cushman SM et al GEMoEaRtCTiMCCRfCACCRD.
142. Schmolli HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012; **23**(10): 2479-516.
143. Gill S, Dowden S, Colwell B, Collins LL, Berry S. Navigating later lines of treatment for advanced colorectal cancer - optimizing targeted biological therapies to improve outcomes. *Cancer treatment reviews*. 2014; **40**(10): 1171-81.
144. Wilhelm SM, Dumas J, Adnane L, Lynch M, Carter CA, Schutz G, et al. Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2011; **129**(1): 245-55.
145. Mross K, Frost A, Steinbild S, Hedbom S, Buchert M, Fasol U, et al. A phase I dose-escalation study of regorafenib (BAY 73-4506), an inhibitor of oncogenic, angiogenic, and stromal kinases, in patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012; **18**(9): 2658-67.
146. Strumberg D, Scheulen ME, Schultheis B, Richly H, Frost A, Buchert M, et al. Regorafenib (BAY 73-4506) in advanced colorectal cancer: a phase I study. *British journal of cancer*. 2012; **106**(11): 1722-7.
147. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2013; **381**(9863): 303-12.
148. Wagner AD, Arnold D, Grothey AA, Haerting J, Unverzagt S. Anti-angiogenic therapies for metastatic colorectal cancer. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2009; (3): CD005392.
149. Loupakis F, Bria E, Vaccaro V, Cuppone F, Milella M, Carlini P, et al. Magnitude of benefit of the addition of bevacizumab to first-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer: meta-analysis of randomized clinical trials. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2010; **29**: 58.
150. Chun YS, Vauthey JN, Boonsirikamchai P, Maru DM, Kopetz S, Palavecino M, et al. Association of computed tomography morphologic criteria with pathologic response and survival in patients treated with bevacizumab for colorectal liver metastases. *Jama*. 2009; **302**(21): 2338-44.
151. Shindoh J, Loyer EM, Kopetz S, Boonsirikamchai P, Maru DM, Chun YS, et al. Optimal morphologic response to preoperative chemotherapy: an alternate outcome end point before resection of hepatic colorectal metastases. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012; **30**(36): 4566-72.
152. Grothey tcoraae, 2012.
153. [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2012/203085lbl.pdf.%20\(2012\)](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/203085lbl.pdf.%20(2012)).
154. J. Li SQ, CONCUR: A RANDOMIZED, DOUBLE-BLIND, PLACEBO-CONTROLLED PHASE 3 STUDY OF REGORAFENIB MONOTHERAPY IN ASIAN PATIENTS WITH PREVIOUSLY TREATED METASTATIC COLORECTAL CANCER (MCRC) *Annals of Oncology* 25 (2): ii105-ii117, 2014.
155. Jeffers MaobsfCs.
156. <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01289821>. 2013.
157. <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01298570>. 2013.
158. Cortez MA, Calin GA. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert opinion on biological therapy*. 2009; **9**(6): 703-11.
159. Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nature reviews Clinical oncology*. 2014; **11**(3): 145-56.
160. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005; **435**(7043): 834-8.
161. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews Cancer*. 2006; **6**(11): 857-66.
162. Michael MZ, SM OC, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Molecular cancer research : MCR*. 2003; **1**(12): 882-91.

163. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nature reviews Clinical oncology*. 2011; **8**(8): 467-77.
164. Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, et al. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Current biology : CB*. 2007; **17**(15): 1298-307.
165. Peter ME. Let-7 and miR-200 microRNAs: guardians against pluripotency and cancer progression. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2009; **8**(6): 843-52.
166. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. 2007; **133**(2): 647-58.
167. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British journal of haematology*. 2008; **141**(5): 672-5.
168. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews Immunology*. 2002; **2**(8): 569-79.
169. Michael A, Bajracharya SD, Yuen PS, Zhou H, Star RA, Illei GG, et al. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral diseases*. 2010; **16**(1): 34-8.
170. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; **103**(7): 2257-61.
171. Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*. 2008; **27**(15): 2128-36.
172. Yu Y, Kanwar SS, Patel BB, Oh PS, Nautiyal J, Sarkar FH, et al. MicroRNA-21 induces stemness by downregulating transforming growth factor beta receptor 2 (TGFbetaR2) in colon cancer cells. *Carcinogenesis*. 2012; **33**(1): 68-76.
173. Dewes M, Fox JL, Hultine S, Sundaram P, Wang W, Liu YY, et al. The myc-miR-17~92 axis blunts TGF{beta} signaling and production of multiple TGF{beta}-dependent antiangiogenic factors. *Cancer research*. 2010; **70**(20): 8233-46.
174. Nugent M, Miller N, Kerin MJ. Circulating miR-34a levels are reduced in colorectal cancer. *Journal of surgical oncology*. 2012; **106**(8): 947-52.
175. Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*. 2009; **58**(10): 1375-81.
176. Bleday R. Local excision of rectal cancer. *World journal of surgery*. 1997; **21**(7): 706-14.
177. Liu K, Li G, Fan C, Zhou X, Wu B, Li J. Increased expression of microRNA-21 and its association with chemotherapeutic response in human colorectal cancer. *The Journal of international medical research*. 2011; **39**(6): 2288-95.
178. Valeri N, Gasparini P, Braconi C, Paone A, Lovat F, Fabbri M, et al. MicroRNA-21 induces resistance to 5-fluorouracil by down-regulating human DNA MutS homolog 2 (hMSH2). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; **107**(49): 21098-103.
179. Lin M, Chen W, Huang J, Gao H, Ye Y, Song Z, et al. MicroRNA expression profiles in human colorectal cancers with liver metastases. *Oncology reports*. 2011; **25**(3): 739-47.
180. Tang W, Zhu Y, Gao J, Fu J, Liu C, Liu Y, et al. MicroRNA-29a promotes colorectal cancer metastasis by regulating matrix metalloproteinase 2 and E-cadherin via KLF4. *British journal of cancer*. 2014; **110**(2): 450-8.
181. Hansen TF, Sorensen FB, Lindebjerg J, Jakobsen A. The predictive value of microRNA-126 in relation to first line treatment with capecitabine and oxaliplatin in patients with metastatic colorectal cancer. *BMC cancer*. 2012; **12**: 83.
182. Hansen TF, Carlsen AL, Heegaard NH, Sorensen FB, Jakobsen A. Changes in circulating microRNA-126 during treatment with chemotherapy and bevacizumab predicts treatment response in patients with metastatic colorectal cancer. *British journal of cancer*. 2015; **112**(4): 624-9.
183. Cheng H, Zhang L, Cogdell DE, Zheng H, Schetter AJ, Nykter M, et al. Circulating plasma MiR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis. *PLoS one*. 2011; **6**(3): e17745.
184. Pu XX, Huang GL, Guo HQ, Guo CC, Li H, Ye S, et al. Circulating miR-221 directly amplified from plasma is a potential diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is correlated with p53 expression. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2010; **25**(10): 1674-80.
185. Sargent D, Sobrero A, Grothey A, O'Connell MJ, Buyse M, Andre T, et al. Evidence for cure by adjuvant therapy in colon cancer: observations based on individual patient data from 20,898 patients on 18 randomized trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009; **27**(6): 872-7.

186. Wang Q, Huang Z, Ni S, Xiao X, Xu Q, Wang L, et al. Plasma miR-601 and miR-760 are novel biomarkers for the early detection of colorectal cancer. *PloS one*. 2012; **7**(9): e44398.
187. Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *Jama*. 2008; **299**(4): 425-36.
188. Toiyama Y, Takahashi M, Hur K, Nagasaka T, Tanaka K, Inoue Y, et al. Serum miR-21 as a diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2013; **105**(12): 849-59.
189. Liu K, Li G, Fan C, Zhou X, Wu B, Li J. Increased expression of microRNA-21 and its association with chemotherapeutic response in human colorectal cancer. *The Journal of international medical research*. 2011; **39**(6): 2288-95.
190. Tang W, Zhu Y, Gao J, Fu J, Liu C, Liu Y, et al. MicroRNA-29a promotes colorectal cancer metastasis by regulating matrix metalloproteinase 2 and E-cadherin via KLF4. *British journal of cancer*. 2014; **110**(2): 450-8.
191. Nugent M, Miller N, Kerin MJ. Circulating miR-34a levels are reduced in colorectal cancer. *Journal of surgical oncology*. 2012; **106**(8): 947-52.
192. Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010; **127**(1): 118-26.
193. Hansen TF, Christensen R, Andersen RF, Sorensen FB, Johnsson A, Jakobsen A. MicroRNA-126 and epidermal growth factor-like domain 7-an angiogenic couple of importance in metastatic colorectal cancer. Results from the Nordic ACT trial. *British journal of cancer*. 2013; **109**(5): 1243-51.
194. Pu XX, Huang GL, Guo HQ, Guo CC, Li H, Ye S, et al. Circulating miR-221 directly amplified from plasma is a potential diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is correlated with p53 expression. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2010; **25**(10): 1674-80.

## Ringraziamenti

Ringrazio sentitamente il prof. Alfredo Falcone che ha permesso la realizzazione di questo lavoro di tesi presso il Polo oncologico dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana; un particolare ringraziamento è rivolto a coloro che mi hanno costantemente seguita nella stesura di questo elaborato, il dr. Fotios Loupakis e la dr.ssa Marta Schirripa; li ringrazio per i consigli, la pazienza, la fiducia concessa e per tutto il tempo investito nel perfezionamento di questo lavoro: la loro professionalità e competenza sono state indispensabili per arrivare oggi a questo traguardo. Vorrei ringraziare anche tutti i colleghi del Polo Oncologico, la dr.ssa Antoniotti, la dr.ssa Cremolini, la dr.ssa Dell'Aquila, la dr.ssa Marmorino, il dr. Moretto, la dr.ssa Pasquini, il dr. Rossini, la dr.ssa Salvatore e la dr.ssa Zoratto che hanno collaborato a questo progetto e hanno contribuito alla mia crescita professionale.

Ringrazio inoltre la dott.ssa Laura Poliseno e tutti colleghi dei laboratori dell'Unità di Oncogenomica dell'ITT, che mi hanno seguita e consigliata al meglio nello svolgimento della parte pratica di questo lungo lavoro

Adesso inizia la lunga lista di tutti coloro che in questi sei anni mi hanno dato la stabilità necessaria e un fondamentale supporto morale per proseguire serenamente gli studi; un ringraziamento particolare va alla mia famiglia, a mia mamma Cristina che in tutti questi anni mi ha sostenuta e incoraggiata senza mai perdersi d'animo anche nei momenti più difficili, con lei più di tredici anni fa ho condiviso il desiderio di percorrere questa lunga strada, e vorrei ringraziarla per aver sempre sostenuto le mie scelte; ringrazio anche mio fratello Emanuele per avermi costantemente presa in giro per la mole di studio.

Un grazie sincero va ai miei nonni e in particolare alle carissime nonne, Adriana e Rosanna, le prime a credere e a fare il tifo per me. Colgo l'occasione per ringraziare anche tutti i miei zii, e in particolare Clara e Maria sempre attive nel momento del bisogno.

Vorrei ringraziare per le risate e le serate trascorse insieme anche tutti gli amici “storici”, Antonella, Chiara, Claudia, Giacomo, Elisa, Elena, Francesca, Luigi e Matteo, per aver condiviso con me questo giorno importante. Un ringraziamento speciale va a Glenda, che mi ha sempre supportato (e sopportato) in numerosi momenti difficili.

Vorrei ringraziare anche tutti i miei compagni di corso, e in particolare Giulia, Elena, Emanuela, Margherita, Vincenzo, Valerio ed Elisa e Silvia con cui ho condiviso diverse tappe di questo percorso di studio.

Ringrazio anche Dalila, Maria Grazia, Valeria e Azzurra, care amiche e compagne di avventure; desidero ringraziare Mattia per le belle parole che riserva sempre per me e per il coraggio che mi trasmette, tu “sei il numero uno!”

Un grazie senza fine va a quella persona speciale di nome Silvia Garibaldi, con te ho passato dei momenti eccezionali, gli anni più formativi e divertenti della mia vita, la forza che mi trasmetti è unica, la tua amicizia più preziosa di una perla rara, ti voglio un bene immenso amica mia

Desidero dedicare l'intero lavoro svolto a Paolo Borelli, oggi e per sempre nei miei pensieri e nel mio cuore.