



## Università di Pisa

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale  
Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e dell'Area Critica  
Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie  
in Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

**Studio di fase II di rechallenge con cetuximab in pazienti con  
mCRC, *RAS* e *BRAF* wild – type, progrediti, dopo  
un iniziale beneficio, ad una terapia di I linea  
contenente cetuximab. Studio CRICKET.**

Candidato:

Antonio Pellino

Relatore:

Chiar.mo Prof. Alfredo Falcone

Anno Accademico 2014-2015

## **INDICE**

Riassunto p.4

### **Capitolo 1 “Il tumore del colon retto”**

1.1	Epidemiologia	p.7
1.2	Eziologia e fattori di rischio	p.8
1.3	Prevenzione primaria e screening del CCR	p.14
1.4	Patogenesi molecolare	p.18
1.5	Cenni di anatomia patologica	p.20
1.5.1	Aspetto macroscopico	p.20
1.5.2	Aspetto microscopico	p.21
1.6	Presentazione clinica e diagnosi	p.22
1.7	Stadiazione e Prognosi	p.25
1.8	Cenni di chirurgia	p.30
1.8.1	Chirurgia del colon	p.30
1.8.2	Chirurgia del retto	p.32
1.9	Cenni di terapia adiuvante	p.34
1.10	Cenni di terapia neoadiuvante	p.41

### **Capitolo 2 “Malattia metastatica”**

2.1	Introduzione	p.44
2.2	Chemioterapia	p.44
2.3	Farmaci a bersaglio molecolare	p.50
2.3.1	Farmaci antiangiogenetici	p.50

2.3.2 Farmaci anti-EGFR	p.57
2.4 Trattamento di prima linea della malattia metastatica	p.65
2.5 Seconda linea e successive	p.67
<b>Capitolo 3 “ Studio Cricket”</b>	
3.1 Acronimo	p.69
3.2 Introduzione e rationale dello studio	p.69
3.2.1 Pathway EGFR e meccanismi di resistenza	p.69
3.2.2 Eterogeneità tumorale	p.72
3.3 Disegno dello studio	p.78
3.4 Obiettivi dello studio	p.78
3.5 Considerazioni statistiche	p.79
3.6 Centri partecipanti e durata dello studio	p.79
3.7 Materiali e metodi	p.79
3.7.1. Selezione dei pazienti	p.80
3.7.2. Trattamento e riduzione della dose	p.81
3.7.3. Procedure dello studio	p.82
3.7.4 Analisi del DNA tumorale libero circolante	p.83
3.8 Risultati	p.84
3.9 Discussione	p.87
4. Conclusioni	p.89
Bibliografia	p.90
Ringraziamenti	

## RIASSUNTO

Cetuximab e panitumumab sono anticorpi monoclonali anti-EGFR, entrati da circa dieci anni a far parte dell'armamentario terapeutico per il trattamento del carcinoma coloretale metastatico (mCRC). Negli anni si è compreso che non tutti i pazienti con mCRC beneficiano di tali farmaci e che la presenza di mutazioni attivanti il pathway di EGFR (in particolare a carico dei geni della famiglia *RAS*, *KRAS* e *NRAS*) determina resistenza intrinseca a tali anticorpi, il cui utilizzo viene pertanto oggi ristretto ai pazienti con malattia *RAS* wild-type. Diversi studi hanno poi dimostrato che pazienti portatori della mutazione V600E di *BRAF* hanno una prognosi peggiore, mentre il ruolo di tale mutazione nel predire resistenza agli anti-EGFR resta ancora dibattuto. Evidenze crescenti hanno inoltre cercato di svelare i meccanismi alla base della resistenza acquisita agli anticorpi anti-EGFR, che si sviluppa inevitabilmente durante o dopo il trattamento e che è alla base dell'evidenza clinica di progressione di malattia. Dati recenti hanno individuato nell'eterogeneità dei tumori coloretali, un ruolo centrale nel guidare questa resistenza. Negli ultimi anni numerose evidenze hanno mostrato come ogni tumore possa essere effettivamente visto come un microcosmo eterogeneo, costituito da diversi cloni cellulari, in continua evoluzione, dinamico dal punto di vista molecolare, pronto a modificarsi in seguito ai trattamenti. Sulla base di tali dati, si pensa dunque che il ricorso a terapie a base di anticorpi anti-EGFR in pazienti con mCRC *RAS* wild-type, potrebbe portare alla distruzione dei cloni cellulari *RAS* wild-type e alla selezione dei cloni mutati già presenti all'interno del tumore, responsabili della progressione di malattia dopo un' iniziale riduzione tumorale. La comparsa di mutazioni dei geni *RAS* al momento della progressione di malattia rappresenterebbe pertanto un meccanismo di resistenza acquisita agli anti-EGFR. Nel 2012 Santini et al. hanno pubblicato uno studio retrospettivo che ha messo in luce un potenziale beneficio dal rechallenge con cetuximab, ovvero il riutilizzo del farmaco, in 39 pazienti con mCRC già progrediti ad una precedente terapia contenente cetuximab, lasciando aperto il quesito su come un tumore divenuto resistente potesse poi nuovamente divenire sensibile al farmaco anti-EGFR. Trattandosi di una preliminare esperienza retrospettiva, questi dati richiedevano una conferma prospettica.

A tale proposito, è stato disegnato lo studio di fase II CRICKET a singolo braccio, multicentrico, condotto in 11 centri Italiani. Questo studio prevedeva di arruolare pazienti con mCRC *KRAS*, *NRAS* e *BRAF* wild-type che avessero ottenuto beneficio dal trattamento di prima linea a base di cetuximab e irinotecano e fossero progrediti entro 4 settimane dall'ultima somministrazione di cetuximab. I pazienti dovevano inoltre aver ricevuto una seconda linea di trattamento contenente oxaliplatino e bevacizumab. Lo studio prevedeva di trattare pazienti che presentassero tutte queste caratteristiche con un rechallenge in terza linea con cetuximab e irinotecano. L'end-point primario dello studio era il tasso di risposte (RR), valutato secondo i criteri RECIST v 1.1. Gli end-points secondari includevano la sopravvivenza libera da progressione (PFS), la sopravvivenza globale (OS), il profilo di tossicità valutato secondo i criteri del National Cancer Institute Common Toxicity V 4.03, e infine la valutazione di eventuali potenziali biomarcatori predittivi e/o prognostici.

In accordo al disegno di Fleming single-stage, selezionando  $p_0$  (RR nell'ipotesi nulla) = 0.05, e  $p_1$  (RR nell'ipotesi alternativa) = 0.20, e considerando l'errore alpha (a 1 coda) e quello beta uguali a 0.05 e 0.20 rispettivamente, erano necessari 27 pazienti. Lo studio sarebbe stato giudicato positivo (e quindi la strategia terapeutica promettente) se almeno 4 pazienti avessero ottenuto una risposta obiettiva, confermata in almeno due rivalutazioni successive secondo i criteri RECIST v1.1.

Da Agosto 2014 ad oggi, sono stati arruolati nello studio 11 pazienti, 8 maschi e 3 femmine, con età mediana di 70 anni (range 45-77), ECOG Performance Status 0/1-2 rispettivamente in 8 e 3 pazienti. Il tumore primitivo è localizzato al colon destro in 4 pazienti, colon sinistro in altri 4 e retto extraperitoneale in 2 casi. Due pazienti presentavano il primitivo in sede al momento dell'arruolamento nello studio. La malattia metastatica era sincrona in 8 pazienti, e tutti e 3 i pazienti con malattia metacrona avevano ricevuto una precedente terapia adiuvante con oxaliplatino. Due pazienti presentavano malattia limitata al fegato e 7 pazienti avevano multiple sedi metastatiche.

La miglior risposta osservata su 9 pazienti attualmente valutabili, è stata la seguente: 4 risposte parziali (RP), 2 stabilità di malattia (SD), 3 progressioni di malattia (PD). Solo 3 RP sono state confermate alla seconda rivalutazione TC secondo i criteri RECIST v1.1. Un paziente non è stato valutato per la risposta

perchè deceduto prima della rivalutazione TC in seguito a sepsi. L'undicesimo paziente arruolato non ha ancora eseguito la prima rivalutazione TC. Al momento dati relativi agli end-points secondari PFS e OS non sono disponibili e verranno valutati quando il follow up sarà più esteso.

Lo studio CRICKET prevedeva inoltre l'analisi del DNA tumorale libero circolante (circulating free tumor DNA, cftDNA) su prelievi di plasma raccolti al momento dell'arruolamento in studio e durante il trattamento. Al momento sono disponibili i dati relativi all'analisi basale su 10 degli 11 pazienti arruolati nello studio. Sono state ricercate le seguenti mutazioni: *KRAS* G12D, *KRAS* G12V, *KRAS* G12C, *KRAS* G12A, *KRAS* G12R, *KRAS* G12S, *KRAS* G12D, *BRAF* V600E, *EGFR* S492R. Le analisi del cftDNA ai vari timepoints previsti dal protocollo sono in corso. Otto pazienti sono risultati wild-type per tutte le mutazioni analizzate, mentre in 2 pazienti è stata individuata la mutazione G12D di *KRAS*. Entrambi questi pazienti sono rapidamente progrediti senza beneficiare per niente del trattamento di rechallenge.

I risultati preliminari dello studio CRICKET sono promettenti. In base a questi risultati, alcuni pazienti *KRAS*, *NRAS* e *BRAF* wild-type che hanno inizialmente risposto e sono poi progrediti ad una prima linea a base di irinotecano e cetuximab, sembrano beneficiare ancora, dopo una seconda linea di terapia diversa dalla prima, di una terza linea di trattamento con cetuximab e irinotecano. Lo studio è attualmente in corso, per cui dati definitivi relativi all'attività ed efficacia del trattamento saranno disponibili in futuro. L'analisi del cftDNA su plasma raccolto al momento dell'inizio del rechallenge sembra suggerire che pazienti con evidenza di mutazione di *KRAS*, probabilmente sviluppata come meccanismo di resistenza acquisita al trattamento di prima linea, non beneficerebbero di questa strategia.

## Capitolo 1. Il tumore del colon retto

### 1.1 Epidemiologia

L'incidenza e la mortalità del cancro coloretale (CRC) variano marcatamente nel mondo. Globalmente il CRC è il terzo tumore più diagnosticato nei maschi e il secondo nelle femmine, con oltre 1,4 milioni di nuovi casi e 694000 morti stimati nel 2012. L'incidenza è più alta nei maschi che nelle femmine<sup>1</sup> e può variare di oltre 10 volte tra i vari paesi, osservando tassi più elevati in Australia, Nuova Zelanda, Europa e Nord America, mentre in Africa e Asia centrale e meridionale si registrano quelli più bassi; diversi stili di vita, nutrizionali e comportamentali, possono spiegare tali differenze geografiche.<sup>2</sup>Nelle ultime due decadi sia l'incidenza che la mortalità statunitensi per CRC stanno lentamente ma stabilmente diminuendo del 2-3 % annui;<sup>3</sup> cambiamenti nei fattori di rischio, un aumento del ricorso alla colonscopia tra i 50 e i 75 anni come mezzo di screening, l'impiego delle terapie adiuvanti possono spiegare almeno in parte questo declino. Bisogna precisare che nel caso degli USA la riduzione della mortalità è cominciata prima che le moderne tecniche di screening e terapie adiuvanti venissero largamente impiegate.<sup>4</sup>D'altra parte, sempre negli USA, si è osservato un aumento dell'incidenza dell'1.8% annua, nel periodo 1992-2012 negli uomini e donne con meno di 50 anni, fascia di età questa che non viene generalmente indagata con mezzi di screening.<sup>5</sup>Negli USA vengono diagnosticati annualmente approssimativamente 132,700 nuovi casi, dei quali 93090 sono tumori del colon e i rimanenti tumori rettali .<sup>6</sup> Il tasso di mortalità annuo tra gli americani è di circa 49700 costituendo l'8% circa di tutte le morti per tumore. L'incidenza degli altri paesi occidentali è rimasta stabile o è leggermente aumentata durante lo stesso periodo. Al contrario l'incidenza del CCR è rapidamente cresciuta in numerose aree storicamente a basso rischio, come la Spagna, l'est Europeo e Asia orientale.<sup>7</sup>Per quanto riguarda l'Italia il carcinoma del colon-retto è in assoluto il tumore a maggiore incidenza nella popolazione italiana, con quasi 52.000 diagnosi stimate per il 2015. Tra gli uomini si trova al terzo posto, preceduto da prostata e polmone (14% di tutti i nuovi tumori), tra le donne al secondo posto, preceduto dalla mammella (13% di tutti i tumori). Nella classifica dei tumori più frequenti per gruppi di età il carcinoma del colon-retto occupa sempre posizioni elevate, variando nelle diverse età tra l'8% e il 14% negli uomini e tra il 5% e il

17% nelle donne. La diffusione dei fattori di rischio, l'anticipazione diagnostica e l'aumento dell'età media della popolazione sono alla base della progressiva crescita dell'incidenza di questo tumore negli ultimi decenni. Il trend temporale per gli uomini è passato da un andamento in crescita (+2,3% l'anno) fino alla metà degli anni Duemila, ad una successiva riduzione (-7,1%/anno), effetti associati con l'attivazione dei programmi di screening organizzati e dei round cosiddetti di prevalenza. Tra le donne l'aumento (+2,1%/anno) e la successiva riduzione (-4,2%/anno) non risultano statisticamente significativi. I confronti geografici nazionali mostrano valori omogenei nel Centro-Nord e inferiori a Sud sia nei maschi (Sud -18% rispetto al Nord) sia nelle femmine (Sud -13%), anch'essi coerenti con la diversa presenza dei fattori precedentemente indicati. Nel 2012 sono stati osservati 19.202 decessi per carcinoma del colon-retto (ISTAT) (di cui il 54% negli uomini) neoplasia al secondo posto nella mortalità per tumore (10% nei maschi, 12% nelle femmine), e tra il secondo e terzo posto nelle varie età della vita. La mortalità per questa patologia è in moderato calo tra i maschi (-0,6%/anno) e più evidente tra le femmine (-1,2%). Si è ridotto il gradiente Nord-Centro-Sud: nelle regioni settentrionali, centrali e meridionali i tassi standardizzati di mortalità per 100.000 sono rispettivamente di 25,2, 24,7 e 21,8 per i maschi e 14,6, 14,4, 13,6 per le femmine.<sup>8</sup>

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

Fattori ambientali e genetici possono aumentare il rischio di sviluppare il CRC. La maggior parte dei casi di CRC diagnosticati sono sporadici (70-80%), soltanto una piccola parte (5-6%) di tumori sono dovuti a forme ereditarie (Sindrome di Lynch, poliposi adenomatosa familiare, poliposi associata a mutazioni del gene MYH) suggerendo che i fattori ambientali giocano un ruolo di primaria importanza nell'insorgenza di questa malattia. Il 20-25 % dei soggetti con cancro coloretale ha un'anamnesi familiare positiva per questa malattia, suggerendone una predisposizione ereditaria che non è stata ben accertata, tanto che in questi casi si parla di CCR familiare.<sup>9</sup>

La malattia si verifica più spesso nelle popolazioni di ceto socioeconomico più elevato che vivono in aree urbane. Studi epidemiologici condotti in vari paesi hanno documentato una correlazione diretta tra mortalità per cancro colo rettale e consumo pro capite di calorie, proteine animali e oli e grassi alimentari, così come



accade per l'aumento della concentrazione sierica di colesterolo e la mortalità per malattia coronarica. Le variazioni geografiche d'incidenza non sembrano correlate a differenze genetiche, dato che popolazioni emigrate tendono a presentare percentuali d'incidenza del cancro del colon tipiche dei paesi adottivi. Ad esempio il confronto dei tassi di mortalità relativi ai giapponesi immigrati negli USA e negli USA da genitori immigrati (Nisei in inglese) mostra che i tassi di mortalità per tumore negli immigrati giapponesi di prima generazione si collocano in una posizione intermedia tra quella dei soggetti nativi del Giappone e dei nativi della California e che i due tassi si avvicinano a ogni generazione che passa. Si ritiene quindi che gli schemi dietetici occidentali influenzino lo sviluppo del CRC.<sup>10</sup> Gli effetti della carne rossa (manzo, maiale, agnello) sono stati analizzati in molti studi epidemiologici; la maggior parte di questi, anche se non tutti, dimostrano un incremento dell'incidenza di adenomi e CCR nei soggetti che assumono grandi quantità di carni rosse.<sup>11</sup> I meccanismi specifici che possono spiegare questa correlazione non sono del tutto chiari. La carne rossa potrebbe stimolare la secrezione endogena di insulina, la quale agisce da mitogeno a livello della mucosa colica. Secondo altre ipotesi, l'elevato contenuto di grassi saturi, ferro eme ed ammine eterocicliche contenute nella carne potrebbero aumentare il rischio. In effetti numerose evidenze dimostrano che l'associazione tra carne rossa e cancro coloretale, potrebbe essere legata ai processi di cottura della carne stessa. Il rischio aumenta nei consumatori di carni fortemente abbrustolite o esposte a prolungate ed elevate temperature; in tali condizioni vengono liberate grandi quantità di ammine eterocicliche che agiscono da mutageni a livello dell'intestino.<sup>12</sup> Sebbene sia stato osservato un significativo aumento del rischio di insorgenza di adenomi e carcinomi colo rettali in pazienti con elevati livelli sierici di colesterolo che assumono con la dieta un'elevata quantità di grassi animali, nessuno studio è riuscito a dimostrare una specifica associazione tra grassi e cancro coloretale. E' stato ipotizzato che l'ingestione di grassi animali, determini un aumento della proporzione di batteri anaerobi nella microflora intestinale, con conseguente conversione dei normali acidi biliari in cancerogeni. Questa suggestiva ipotesi è supportata dal riscontro di un aumento degli anaerobi fecali nelle feci dei pazienti con CRC. L'idea che una dieta ad elevato contenuto di fibre, in particolare di frutta e verdura, sia associata ad un basso rischio di cancro colo rettale, si è fatta strada nelle ultime quattro decadi, suffragata dall'osservazione di

una bassa incidenza di CRC nelle popolazioni Africane che hanno regimi alimentari ricchi di fibre. Le fibre sembrano diminuire o comunque diluire, l'assorbimento di cancerogeni, ridurre il transito delle feci nel colon, ridurre il pH colico, e aumentare la produzione di acidi grassi a catena corta, esercitando dei benefici sulla mucosa dell'intestino.<sup>13</sup> Tuttavia, contrariamente a quanto si riteneva in passato, i risultati di trial randomizzati e di studi caso-controllo hanno dimostrato che la dieta ad alto contenuto di fibre o ricca di frutta e verdura, non è protettiva nei confronti dell'insorgenza del cancro colon rettale o delle recidive da adenomi del colon-retto.<sup>14</sup> L'insieme dei dati epidemiologici, suggerisce comunque che la dieta, in particolare se a elevato consumo di grassi e calorie, rimane il fattore eziologico più importante per il cancro coloretale.<sup>15</sup> Il gran numero di calorie presenti nella dieta occidentale, in combinazione con l'inattività fisica, è associato a una più alta prevalenza di obesità. Gli individui obesi sviluppano insulino-resistenza, con aumentati livelli di insulina circolante che portano a un incremento della concentrazione di fattore di crescita simil insulinico di tipo 1 (*insulin-like growth factor type 1, IGF-1*). Questo fattore di crescita sembra stimolare la proliferazione della mucosa intestinale.<sup>16,17</sup> Il fumo di sigaretta è associato allo sviluppo di adenomi coloretali, soprattutto nei soggetti che fumano da più di 35 anni.<sup>18</sup> Studi di popolazione svolti negli USA hanno stimato che approssimativamente il 15-20 % dei CRC possono essere attribuiti al fumo; la proporzione potrebbe essere più alta per i tumori del retto rispetto a quelli del colon.<sup>19</sup> Probabilmente i prodotti di combustione del tabacco (idrocarburi policiclici aromatici, nitrosammine, ammine aromatiche) si comportano da cancerogeni che possono raggiungere la mucosa rettale per via diretta mediante la digestione, o per via indiretta tramite la circolazione sistemica. Inoltre è dimostrato che smettere di fumare in tarda età non riduce il rischio di tumore, per cui è importante la prevenzione negli adolescenti e giovani adulti e allo stesso tempo convincere i fumatori a smettere di fumare il prima possibile.<sup>20</sup> La relazione tra alcol e CRC è controversa, ma la maggior parte delle evidenze dimostrano che un elevato consumo di alcol può incrementare il rischio di cancro coloretale. L'alcol potrebbe sopprimere la sorveglianza immunitaria, inibire i processi di riparazione del DNA, alterare la composizione degli acidi biliari, o persino indurre gli enzimi del citocromo P450 ad attivare cancerogeni epatici. Appare quindi prudente ridurre

l'assunzione di alcol al fine di prevenire il CRC, specialmente negli individui che ne assumono grandi quantità.<sup>21</sup>

Sono state descritte numerose sindromi caratterizzate dalla presenza di polipi del colon, la maggior parte delle quali vengono ereditate in maniera autosomica dominante e sono associate ad un rischio elevato di sviluppare il CCR. E' stata stabilita la base genetica di queste patologie e questo ha notevolmente migliorato la nostra comprensione della patogenesi molecolare del CRC sporadico. La poliposi adenomatosa familiare (FAP) e la Sindrome di Lynch (hereditary non polyposis colorectal cancer, HNPCC) sono le sindromi familiari più frequenti, tenendo conto che queste due condizioni, prese insieme, sono responsabili di solo il 5% dei casi di CCR.<sup>22,23</sup> La FAP e le sue varianti (Sindrome di Gardner, Sindrome di Turcot) determinano meno dell'1% dei tumori coloretali. Nella forma classica di FAP, numerosi adenomi compaiono durante l'infanzia e l'adolescenza. I sintomi appaiono ad un'età media di 16 anni e il cancro del colon si presenta nel 90% dei pazienti non trattati, spesso prima dei 45 anni di età. Una forma attenuata di FAP definita Attenuated adenomatous polyposis coli (AAPC), determina un rischio analogo di cancro del colon ma è caratterizzata da un numero più basso di adenomi e un'età media di diagnosi di cancro intorno ai 54 anni. La FAP è associata ad una mutazione germinale del gene adenomatous polyposis coli (APC) localizzato sul braccio lungo del cromosoma 5. Lo stesso gene è coinvolto nella forma attenuata di FAP, ma le mutazioni sono localizzate nelle porzioni prossimali o distali e non centrali (come nella variante classica) del gene.<sup>24</sup> Per la diagnosi di FAP classica è necessario andare a valutare endoscopicamente almeno 100 polipi, anche se ce ne possono essere alcune migliaia. Dato il rischio pressoché certo di sviluppare un tumore, la colectomia profilattica rappresenta la terapia standard per gli individui portatori di mutazioni di APC. Questo intervento previene il tumore coloretale ma i pazienti rimangono a rischio di neoplasia in altre sedi; ad esempio possono svilupparsi adenomi altrove nel tratto gastrointestinale, in particolare in posizione adiacente all'Ampolla di Vater e nello stomaco.<sup>25</sup> La FAP è associata ad un gran numero di manifestazioni extraintestinali, tra cui l'ipertrofia congenita dell'epitelio retinico, generalmente diagnosticabile alla nascita e che può costituire un'appendice alla diagnosi precoce. Oltre ai polipi intestinali, i membri delle famiglie colpite dalla Sindrome di Gardner hanno osteomi midollari, cranici e nelle ossa lunghe, cisti epidermiche ,

tumori desmoidi, tumori della tiroide e anomalie della dentatura, come denti soprannumerari. La sindrome di Turcot è più rara e caratterizzata da adenomi intestinali e tumori del sistema nervoso centrale. Due terzi dei pazienti con Sindrome di Turcot hanno mutazioni del gene APC e sviluppano medulloblastomi. L'altro terzo presenta mutazioni in uno dei geni deputati alla riparazione del DNA e sviluppa glioblastomi. I figli dei pazienti con FAP, spesso ancora in età prepuberale quando questa malattia viene diagnosticata nel genitore, hanno un rischio del 50% di sviluppare la lesione preneoplastica e devono essere attentamente controllati con una sigmoidoscopia con strumento flessibile fino all'età di 35 anni. La sigmoidoscopia è la metodica più adatta per lo screening di questi pazienti perché i polipi tendono a distribuirsi uniformemente tra intestino cieco e regione anale; risultano poco utili metodiche più invasive e costose come la colonscopia o il clisma opaco. Alcuni pazienti affetti da FAP senza perdita di APC presentano mutazioni del gene di riparazione di escissione di basi MUTYH (mutYhomolog).<sup>26</sup>

La Sindrome di Lynch o sindrome non poliposica del carcinoma coloretale ereditario (HNPCC), è una malattia autosomica dominante, più comune della FAP, responsabile di circa il 3-5% di tutti i CCR. LA HNPCC è causata da mutazioni ereditarie nei geni che codificano per le proteine responsabili dell'identificazione, escissione e riparazione degli errori che si verificano durante la replicazione del DNA. Ci sono almeno cinque geni riparatori dei mismatch, ma la maggior parte dei casi di HNPCC riguarda i geni MSH2 e MLH1, meno frequentemente vengono coinvolti MSH6 e PMS2. I pazienti con la sindrome di Lynch ereditano una mutazione germinale a livello di uno degli alleli del gene del mismatch repair, per cui quando si avrà una mutazione somatica nel secondo allele o un silenziamento epigenetico mediante l'ipermetilazione del promotore, la riparazione difettosa dei mismatch porta all'accumulo di mutazioni a velocità fino a 1000 volte superiori al normale, soprattutto in regioni contenenti sequenze brevi di DNA a ripetizione, dette DNA micro satellite; si determina così un'instabilità dei micro satelliti (MSI). Il genoma umano contiene circa 50.000-100.000 microsatelliti, che rappresentano le sedi più frequenti di mutazioni nella HNPCC.<sup>27,28</sup> Nel 1991 un gruppo internazionale di ricercatori ha stilato i Criteri di Amsterdam per identificare i pazienti in cui sospettare la sindrome, successivamente modificati nel 1999 nei criteri di Amsterdam II, con l'aggiunta dei tumori extracolici.

### Criteria di Amsterdam II (1999)

Diagnosi di CRC (o di tumori extracolici associati alla LS) prima dei 50 anni 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

Il 40% dei casi di famiglie con criteri di Amsterdam positivi non presenta fenotipo MSI sul tessuto tumorale, ed è definito stabile (MSS) all'analisi dei microsatelliti. Secondo recenti linee guida, queste forme familiari sono oggi classificate Familial Colorectal Cancer Type X.<sup>29</sup> Si riserva la definizione di LLS (Lynch like syndrome) solo ai soggetti nei quali test biomolecolari hanno dimostrato la presenza di instabilità dei microsatelliti (MSI) o alterazioni dell'espressione dei geni del mismatch repair ma che non presentano mutazioni germinali.<sup>30</sup> Nei pazienti colpiti da HNPCC, i tumori del colon tendono a comparire in età più giovane rispetto ai tumori del colon sporadici (età media 48 anni) e sono spesso localizzati nel colon destro. Un 10% dei pazienti presenta tumori sincroni. Nei pazienti che hanno subito una resezione colica, la possibilità di sviluppare tumori coloretali metacroni è del 16% a 10 anni, e del 62% a 30 anni di distanza dalla prima resezione.<sup>27</sup> Tumori extracolici sono estremamente comuni nella sindrome di Lynch; in particolare il carcinoma dell'endometrio può essere presente fino al 60% delle donne portatrici della mutazione.<sup>31</sup> Altre sedi che possono essere coinvolte sono lo stomaco, l'ovaio, l'uretere, cervello, intestino tenue, vie epatobiliari e cute.<sup>32</sup> L'incidenza del cancro coloretale è aumentata nei pazienti affetti da malattia infiammatoria intestinale di lunga durata. Vi è una ben documentata associazione tra rettocolite ulcerosa e insorgenza di CRC, il cui rischio aumenta all'aumentare della durata, estensione e attività della malattia infiammatoria stessa. Una colite ulcerosa estesa a tutto il colon (pancolite), ad esempio, aumenta il rischio di CRC di circa 5-15 volte rispetto alla popolazione generale, mentre una malattia limitata al colon sinistro di circa tre volte. Il rischio non sembra aumentato nella malattia limitata al retto o al retto-sigma. Il rischio di cancro coloretale in un paziente con

pancolite è relativamente basso durante i primi 8-10 anni della malattia, ma sembra poi aumentare di un tasso di circa 0.5-1% l'anno. La frequenza di cancro in individui sintomatici varia tra l'8 e il 30% dopo 25 anni; il rischio è generalmente più alto nei soggetti giovani con pancolite.<sup>33,34</sup> Sebbene vi siano dati meno consistenti, sembra che la pancolite dovuta a malattia di Crohn sia associata ad uno stesso rischio relativo di sviluppare CCR.

Gli Afroamericani registrano l'incidenza più alta di CCR, più di qualsiasi altro gruppo etnico presente negli USA. La mortalità è del 20% più alta negli Afroamericani che nei bianchi.<sup>35</sup> In aggiunta la frequenza di CCR sotto i 50 anni è più frequente negli Afroamericani. La mortalità è del 25% più alta negli uomini che nelle donne, e sia polipi adenomatosi che i CCR si presentano in sede più prossimale nelle donne (specie in menopausa) rispetto agli uomini.<sup>36</sup> Nessuna delle maggiori organizzazioni di prevenzione statunitensi raccomandano di stratificare lo screening in base alla razza, etnia e genere di appartenenza, sebbene alcuni autori sostengano che ciò debba essere considerato.<sup>37</sup>

### **1.3 Prevenzione primaria e screening del CCR**

Per quanto appena detto, il CCR è un tumore con forte impatto epidemiologico, elevati tassi di incidenza e mortalità. Si stima che il 70% dei casi di CCR potrebbero essere evitati con una *prevenzione primaria* fondata su uno stile di vita sano.<sup>38</sup> Un panel di esperti del National Cancer Institute negli USA, tenendo in considerazione i fattori di rischio ha elaborato una serie di raccomandazioni più generali riguardanti lo stile di vita per prevenire l'insorgenza di questa malattia:

- Aumentare l'attività fisica (circa 30 minuti/die);
- Non fumare (negli Stati Uniti circa 1 su 5 casi di tumori del colon retto nei maschi ed 1 su 8 nelle donne sembra essere correlato al fumo di sigaretta);
- Migliorare la dieta : limitare l'uso di alcol; ridurre l'assunzione di grassi al 30% dell'introito calorico; aumentare la dose di fibre a circa a 30 gr/die; preferire zuccheri non raffinati; mangiare almeno 5 porzioni di frutta e verdura o vegetali al giorno; moderare il consumo di sale e cibi conservati/affumicati.<sup>9</sup>

L'assunzione regolare di acido acetilsalicilico riduce sia lo sviluppo di adenomi e carcinomi del colon. Sembra diminuire anche la probabilità d'insorgenza di nuovi

adenomi premaligni dopo trattamento per un pregresso carcinoma del colon. Questo effetto inibitorio sulla cancerogenesi aumenta con il prolungarsi della durata di somministrazione del farmaco e con l'aumentare della dose. Al momento l'uso routinario di acido acetilsalicilico nella popolazione generale, non è raccomandato a causa delle potenziali tossicità. Studi futuri permetteranno di individuare sottogruppi di popolazione che potrebbero beneficiare della terapia.<sup>39</sup> Dato che la trasformazione neoplastica della mucosa colo rettale si realizza attraverso un processo multifasico che evolve nel tempo, la *prevenzione secondaria* costituisce uno strumento importante per la diagnosi precoce che permette di poter impostare tempestivamente una terapia adeguata e ridurre la mortalità specifica per tumore. Tale intervento ha un peso particolarmente importante nel carcinoma coloretale, 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.<sup>40</sup> 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.

Le scelte sul miglior programma di screening non sono univoche. 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. Le linee guida statunitensi varate dalla US Multi - Society Task Force on Colorectal Cancer e l'American College of Radiology in materia di prevenzione dividono due tipologie di metodiche di screening: una mirata primariamente all'individuazione di lesioni sanguinanti, più spesso già neoplastiche e l'altra in grado di rilevare polipi preneoplastici, non sanguinanti. Appartengono al primo gruppo le diverse tecniche di ricerca di sangue occulto nelle feci (RSOF): il test al guaiaco o Hemmocult (Guaiac Fecal Occult Blood Testing, gFOBt); i test di dosaggio

immunochimico fecale (immunochemical Fecal Occult Blood Test, IFOBT, o Fecal immunochemical test, FIT); test di dosaggio della porfirina fecale o Hemoquant e la più recente analisi del DNA fecale ( stool DNA, sDNA, o PreGen-PLUS). Rientrano invece nella seconda categoria la colonscopia, il clisma opaco a doppio contrasto e la più innovativa colonscopia virtuale.<sup>41</sup>

La RSOF è la metodica più accettabile, ma ha bassa sensibilità e deve essere ripetuta ogni due anni affinché lo screening risulti efficace. Inoltre, se positiva, deve essere eseguita una colonscopia totale. Il test al guaiaco o Hemmicult (gFOBT) sfrutta l'attività perossidasi di vari tipi di emoglobina, compresa quella di origine animale, e solitamente viene effettuata su tre campioni fecali differenti per aumentarne la sensibilità ; vengono di solito effettuati in regime di restrizione dietetica, per periodi di tre o più giorni. I test immunochimici , invece sono specifici per l'emoglobina umana e pertanto non richiedono alcuna restrizione dietetica, con considerevoli vantaggi in termini di accettabilità e facilità di esecuzione. I test immunochimici hanno un migliore bilancio sensibilità specificità e un miglior rapporto costo benefici rispetto al tradizionale test al guaiaco.<sup>42</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>43</sup> Per quanto riguarda le tecniche endoscopiche, la rettosigmoidoscopia (RSS) ha una migliore accettabilità della colonscopia. La sigmoidoscopia con strumento flessibile permette di esaminare la mucosa colica fino a 60 cm 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. Il limite principale è rappresentato dall'impossibilità di esplorare la parte restante del colon.<sup>44</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>45</sup> È indicata come tecnica primaria di screening nei pazienti ad alto rischio<sup>40</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>46,47</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.

In generale la RSOF prevede l'inizio a 50 anni con frequenza biennale, fino a 69 anni.<sup>48</sup> La RSS ha invece dimostrato di essere efficace (in studi europei) quando eseguita una volta nella vita tra i 55 ed i 64 anni.<sup>49</sup>

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>40</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 al numero e alle caratteristiche cliniche dei polipi (da 2/6 mesi, a 3 anni o 5 anni). 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 5 anni. 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 1-2 anni, tale indicazione è valida anche per i soggetti affetti da malattie infiammatorie croniche.<sup>50</sup> Studi recenti dimostrano che lo screening nei pazienti con FAP e LS riducono l'incidenza e la mortalità per CRC.<sup>51</sup>

#### **1.4 Patogenesi molecolare**

La cancerogenesi del colon è un processo multifasico ed il carcinoma coloretale costituisce un ottimo modello per comprendere come l'accumulo progressivo di mutazioni intese come momenti patologici caratterizzati dalle acquisizioni di funzioni di oncogeni o dalla perdita di funzioni di un gene oncosoppressore, conducono alla trasformazione della mucosa colica normale in adenocarcinoma. La combinazione di eventi molecolari che portano all'adenocarcinoma del colon è molto varia e comprende anomalie genetiche ed epigenetiche. Sono state descritte almeno due vie genetiche distinte. Si tratta della *via APC /  $\beta$  - catenina*, associata a *WNT* e alla classica sequenza adenoma carcinoma e della via dell'instabilità dei microsatelliti, associata a difetti nel sistema dei mismatch di DNA. Entrambe le vie implicano il graduale accumulo di mutazioni multiple, ma i geni coinvolti e i meccanismi di accumulo differiscono. Eventi epigenetici, il più comune dei quali è il silenziamento genico indotto dalla metilazione, possono accentuare la progressione lungo entrambe le vie.

La classica sequenza adenoma – carcinoma, che rappresenta fino all'80% dei tumori del colon sporadici, comprende in genere la mutazione di *APC* all'inizio del processo neoplastico. Entrambe le copie del gene *APC* devono essere disattivate dal punto di vista funzionale, tramite mutazione o eventi epigenetici, perché si sviluppino adenomi. *APC* è un regolatore negativo essenziale della  $\beta$  – catenina, un componente della via di segnalazione di *WNT*. Normalmente la proteina *APC* si lega e promuove la degradazione della  $\beta$  – catenina. Con la perdita della funzione di *APC*, la  $\beta$  – catenina si accumula e trasloca verso il nucleo, dove attiva la trascrizione di geni, ad esempio quelli che codificano *MYC* e la ciclina D1, che promuovono la proliferazione. Questa fase è seguita da ulteriori modificazioni, comprese le mutazioni attivanti in *KRAS*, che promuovono la crescita e

prevengono l'apoptosi. La conclusione secondo la quale la mutazione di *KRAS* sia un evento tardivo è sostenuta dall'osservazione secondo la quale le mutazioni sono presenti in meno del 10% degli adenomi di diametro inferiore a 1 cm e nel 50% degli adenomi di diametro maggiore di 1 cm ma nel 50% degli adenocarcinomi invasivi. La progressione neoplastica è anche associata a mutazioni in altri geni oncosoppressori, quali quelli che codificano *SMAD2* e *SMAD4*, attuatori della segnalazione di TGF $\beta$ . Poiché normalmente la segnalazione di TGF $\beta$  inibisce il ciclo cellulare, la perdita di questi geni può consentirne la crescita incontrollata. L'oncosoppressore *p53* risulta mutato nel 70% – 80% dei tumori del colon, mentre è raramente coinvolto negli adenomi, e questo suggerisce che le mutazioni di *p53* si possano verificare in fase avanzata della progressione tumorale. La “perdita di funzione” di *p53* e di altri geni oncosoppressori è spesso causata da delezioni cromosomiche, e questo sottolinea che l'instabilità cromosomica è una caratteristica della via *APC /  $\beta$  – catenina*. In alternativa, i geni oncosoppressori possono essere silenziati dalla metilazione di una zona ricca di CpG, o isola CpG, una regione 5' di alcuni geni che spesso comprende il promotore e il sito di inizio della trascrizione. Anche l'espressione delle telomerasi aumenta a mano a mano che le lesioni avanzano. Nei pazienti che hanno un deficit della riparazione dei mismatch del DNA si accumulano ripetizioni dei microsatelliti, una condizione detta instabilità dei microsatelliti. Se queste mutazioni sono in genere silenti perché i microsatelliti si trovano tipicamente in regioni non codificanti, alcune sequenze di microsatelliti si trovano nella regione non codificante o promotrice dei geni coinvolti nella regolazione della crescita cellulare, ad esempio quelli che codificano per il recettore TGF $\beta$  di tipo 2, possono contribuire a una crescita incontrollata per la proteina proapoptotica BAX. Poiché TGF $\beta$  inibisce la proliferazione delle cellule epiteliali del colon, i mutanti del recettore TGF $\beta$  di tipo 2 possono contribuire a una crescita cellulare incontrollata, mentre la perdita di BAX può aumentare la sopravvivenza dei cloni geneticamente anomali. Mutazioni nell'oncogene *BRAF* e il silenziamento di gruppi distinti di geni dovuti all'ipermetilazione dell'isola CpG sono anch'essi comuni nei tumori che si sviluppano a causa di difetti del sistema di riparazione del mismatch del DNA. Al contrario in genere *KRAS* e *p53* non subiscono mutazioni. Di conseguenza la combinazione di instabilità dei

microsatelliti, mutazione di *BRAF* e bersagli specifici, quali *MLH1*, costituisce la firma di questa via di cancerogenesi.<sup>52</sup>

Esiste poi un terzo gruppo di tumori del colon che presenta un aumento della metilazione dell'isola CpG in assenza di instabilità dei microsatelliti. Molti di questi tumori nascondono mutazioni di *KRAS*, mentre le mutazioni *p53* e *BRAF* sono piuttosto rare. Al contrario le mutazioni di *p53* sono comuni nei tumori del colon che non mostrano un fenotipo metilatore dell'isola CpG.<sup>53</sup>Tale trasformazione richiede un periodo lungo di tempo (circa 15-20 anni) ed è caratterizzata da modificazioni parallele del versante molecolare ed istologico.

## **1.5 Cenni di anatomia patologica**

### *1.5.1 Aspetto macroscopico*

La maggior parte dei carcinomi coloretali, indipendentemente dall'eziologia, deriva da polipi adenomatosi che costituiscono lesioni precancerose. Circa il 30% della popolazione in età media e il 50% dei soggetti in età avanzata presentano polipi adenomatosi del colon, tuttavia, meno dell'1% dei polipi si trasforma in una lesione maligna; il rischio aumenta all'aumentare del numero dei polipi, per lesioni di dimensioni > 2cm, con istologia villosa e contenenti foci displastici. In linea generale, gli adenocarcinomi sono distribuiti abbastanza equamente lungo tutta la lunghezza del colon. I tumori del colon prossimale tendono ad accrescersi come masse polipoidi esofitiche che si estendono lungo una parete del cieco e del colon ascendente, raramente questi tumori causano occlusioni. Al contrario i carcinomi del colon distale tendono ad essere lesioni a crescita circonferenziale anulare e producono stenosi e restringimento luminale fino ad arrivare all'occlusione. Entrambe le formazioni si sviluppano con il tempo nella parete intestinale e possono risultare come masse palpabili dure.

Secondo la classificazione di Bormann si distinguono 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 stenotico – forma anulare-stenotico<sup>10</sup>;

### 1.5.2 Aspetto microscopico

La classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) suggerisce la suddivisione in tumori epiteliali, carcinoidi (argentaffini e non), tumori non epiteliali, tumori del sistema emopoietico e forme non classificabili.

Tra i tumori epiteliali distinguiamo:

- adenocarcinoma: rappresenta l'85-90% di tutte le neoplasie coloretali. Comprende tutti i tumori con una componente mucosa inferiore al 50%;
- Adenocarcinoma mucoso (o mucinoso): è caratterizzato dalla presenza di abbondante muco extracellulare, che costituisce più del 50% della massa tumorale; si riscontra nel 10% della casistica. Il suo significato prognostico è controverso e potrà essere definito solo da studi che prenderanno in considerazione anche le caratteristiche genetiche delle neoplasie;
- Carcinoma a cellule con castone (signet-ring cell carcinoma): è costituito per più del 50% da cellule con castone, contraddistinte da un voluminoso vacuolo intracitoplasmatico di muco che disloca alla periferia il nucleo; è a prognosi sfavorevole;
- Carcinoma midollare: è formato prevalentemente da lamine e trabecole solide di cellule in genere regolari e con modeste atipie cellulari e caratterizzato dalla presenza di numerosi linfociti intraepiteliali; ha una prognosi nettamente più favorevole, rispetto alla forma a piccole cellule o anche a cellule con castone;
- Carcinoma indifferenziato: manca degli aspetti morfologici di differenziazione epiteliale;
- Carcinoma a piccole cellule: presenta aspetti morfologici e biologici simili a quelli del carcinoma a piccole cellule polmonari; si caratterizza per prognosi sfavorevole;
- Carcinoma adenosquamoso; raro e caratterizzato da aree squamose miste ad altre con aspetto ghiandolare;
- Carcinoma squamoso: raro

In base alle caratteristiche istologiche, tra cui la conservazione o meno della polarità nucleare, la presenza e configurazione di strutture ghiandolari, il pattern di crescita, l'infiltrazione infiammatoria e la reazione desmoplastica, si identificano 4 gradi (G) di differenziazione cellulare (grading): G1 ben differenziato, G2 moderatamente differenziato, G3 scarsamente differenziato e G4 totalmente indifferenziato. In presenza di eterogeneità intratumorale, in accordo alla WHO, il grado è definito, dalla componente meno differenziata, con l'esclusione dei margini di infiltrazione, dove sono spesso presenti aspetti di disorganizzazione ghiandolare e di apparente scarsa differenziazione. Molti autori sconsigliano di distinguere il grado di differenziazione degli adenocarcinomi mucoidi, per definizione da considerarsi di alto grado (G4). In relazione al decorso clinico, il grading tumorale può essere stabilito sulla base di altri parametri, quali l'invasione vascolare e perineurale, il tipo di crescita (espansiva o infiltrativa), il grado di differenziazione linfocitaria al margine di invasione, la presenza di aggregati linfocitari peritumorali (reazione linfocitaria "tipo Crohn"), il numero di linfociti compenetranti le cellule neoplastiche (tumor infiltrating lymphocytes o TIL) ed il tumor budding. Quest'ultimo si riconosce in piccoli aggregati cellulari e/o singole cellule (massimo 5) di aspetto fusato, che si "distaccano" dal fronte neoplasia ed infiltrano la componente stromale. Nonostante recenti studi confermino la valenza del tumor budding quale fattore prognostico indipendente del CRC, in presenza del quale aumenta la probabilità di metastasi a livello linfonodale, la mancata standardizzazione delle procedure di analisi e dei criteri diagnostici dello stesso, rappresenta l'ostacolo maggiore per un suo routinario utilizzo.<sup>54</sup>

## **1.6 Presentazione clinica e diagnosi**

Nella maggior parte dei casi i CRC in fase iniziale sono asintomatici o presentano una sintomatologia aspecifica. La neoplasia può manifestarsi con una serie di sintomi che possono essere sfumati e vaghi con modeste turbe dell'alvo o vaghe algie addominali, o talvolta sporadiche perdite di sangue dalle feci. Si possono distinguere vari quadri clinici in base alla sede, all'estensione locale e/o a distanza e alle complicanze. Le lesioni del colon destro sono in genere vegetanti e spesso di notevoli dimensioni, talvolta ulcerate e facilmente sanguinanti. Sul piano clinico determinano anemia per stitico cronico di sangue dalla neoplasia ulcerata (sangue difficilmente osservabile macroscopicamente nelle feci), dolore di tipo

gravativo, subcontinuo ai quadranti addominali di destra, e talvolta all'epigastrio, con associata una vaga sintomatologia dispeptica, palpitations e persino angina pectoris associati ad anemia ipocromica microcitica da deficit di ferro. E' apprezzabile talvolta una massa palpabile all'emiaddome destro nelle fasi avanzate di malattia, spesso con anoressia e dimagrimento. Dato che il tumore può sanguinare in modo intermittente, un test per la ricerca del sangue occulto fecale in un campione casuale può risultare negativo; pertanto, la presenza inspiegabile di anemia sideropenia in ogni adulto (con la possibile eccezione di donne multipare in premenopausa) obbliga a un accurato studio endoscopico e/o radiologico dell'intestino crasso. Poiché le feci si solidificano a mano a mano che proseguono lungo il colon trasverso e discendente, i tumori che insorgono in queste sedi tendono a impedirne il passaggio, determinando l'insorgere di crampi addominali, occasionale ostruzione e anche perforazione. Le lesioni che interessano il colon di sinistra, hanno in genere una crescita di tipo infiltrante e ciò può determinare un ostacolo alla canalizzazione. Di conseguenza sono prevalenti i segni ostruttivi e la comparsa dei sintomi è più precoce. Sono tipiche le modificazioni dell'alvo (stipsi e diarrea), ma in genere l'alternanza tra l'una e l'altra, la presenza di sangue nelle feci associata a volte all'emissione di muco, il dolore addominale, spesso intermittente, di intensità variabile ai quadranti sinistri o diffuso a tutto l'addome. Per quanto riguarda le neoplasie che si sviluppano nel retto, esse sono prevalentemente ulcerate e vegetanti e facilmente sanguinanti. A seconda della localizzazione del tumore a livello sopra-ampollare, ampollare, e sottoampollare si distinguono differenti quadri clinici. Le neoplasie soprampollari si caratterizzano per un corteo sintomatologico simile a quelle che si osservano per il colon sinistro, i tumori ampollari danno luogo a tenesmo, senso di corpo estraneo e peso, talvolta associati ad un dolore di tipo gravativo ed a rettorragia con mucorrea, mentre le neoplasie sotto-ampollari si presentano con tenesmo imponente, dolore perineale che si accentua durante la defecazione ed evacuazione di feci nastriformi frammiste a sangue e muco. 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>55</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>56</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).

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>56</sup>

Ogni paziente con sintomi sospetti per tumore coloretale dovrebbe essere sottoposto ad una visita clinica e successivamente ad esami strumentali. La diagnosi clinica si avvale dell'esame obiettivo, che prevede la palpazione dell'addome alla ricerca di eventuali masse a livello dell'intestino, del fegato e dei linfonodi e l'esplorazione rettale. L'esplorazione rettale è una manovra semplice, e costituisce il primo esame da eseguire in caso di presenza di sangue con le feci in quanto consente di individuare il 70% dei tumori del retto. In aggiunta alla clinica esistono diversi esami strumentali che permettono di diagnosticare il tumore. La colonscopia è l'esame più specifico e consente di esplorare tutto il retto e il colon fino al fondo cecale, di individuare la presenza e la localizzazione della neoplasia, di effettuare la tipizzazione mediante biopsia e l'eventuale resezione radicale di polipi, rendendo in tal caso questa indagine anche un utilissimo strumento terapeutico. Tale indagine consentendo l'esplorazione dell'intero viscere, permette di evidenziare eventuali tumori sincroni o polipi, lesioni presenti nel 3-4% e 25-40% rispettivamente. La colonscopia può essere non praticabile per le condizioni generali del paziente, per rifiuto o per stenosi serrata che impedisce l'introduzione o la progressione del colonscopio. In tal caso è possibile utilizzare il clisma a doppio contrasto o la colonscopia virtuale. Entrambe le indagini non sono da considerarsi una vera alternativa alla colonscopia poiché non consentono di individuare lesioni di piccole dimensioni e soprattutto di effettuare prelievi bioptici.<sup>42</sup>

### **1.7 Stadiazione e prognosi**

Nei pazienti con cancro coloretale la prognosi dipende strettamente dal grado di penetrazione della neoplasia nella parete intestinale e dalla presenza sia di interessamento linfonodale regionale che di metastasi a distanza. Queste variabili sono state incorporate nel sistema di stadiazione introdotto da Dukes nel 1932, successivamente modificato da Astler – Coller nel 1954 e, successivamente, da Turnball nel 1967.<sup>54</sup>

### Stadiazione di Dukes modificata

<b>Stadio A:</b> Tumore limitato alla mucosa
<b>Stadio B1:</b> Tumore non esteso oltre la muscolare propria
<b>Stadio B2:</b> Tumore esteso oltre la muscolare propria, senza coinvolgimento linfonodale
<b>Stadio C1:</b> Presenza di metastasi ai linfonodi regionali
<b>Stadio C2:</b> presenza di metastasi ai linfonodi apicali
<b>Stadio D:</b> Presenza di metastasi a distanza

Nella pratica clinica, i criteri che vengono attualmente impiegati per individuare lo stadio clinico patologico sono definiti con il sistema TNM il quale fornisce informazioni più dettagliate rispetto a tutti gli altri sistemi di stadiazione.<sup>57</sup> In tal caso la definizione dello stadio di malattia risulta dalle informazioni relative all'estensione del tumore primitivo (T), al coinvolgimento linfonodale (N) e alla presenza di eventuali metastasi a distanza (M). La più recente classificazione TNM risale al 2010 e include un certo numero di cambiamenti rispetto alla precedente classificazione del 2002.<sup>58</sup> Queste modifiche sono supportate dall'analisi di dati provenienti dalla popolazione inserita nel registro SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results)<sup>59,60</sup> :

- T4 è stato suddiviso in stadio T4a (tumore che penetra la superficie del peritoneo viscerale) e T4b (tumore che invade direttamente o aderente ad altri organi e strutture) identificando sottogruppi di pazienti a differente prognosi;
- Le categorie N1 e N2 sono suddivise in base al numero di linfonodi metastatici coinvolti identificando nuovi gruppi prognostici;
- M1 è stato suddiviso in M1a nel caso di una metastasi ad un solo organo o sito, M1b nel caso di metastasi a più organi o siti o confinata al peritoneo;
- E' stato inserito un nuovo gruppo di pazienti con tumore del colon retto che, anche in assenza di metastasi linfonodali sono classificati N1c per la presenza di depositi tumorali (TD);
- Ulteriore suddivisione dello stadio II in stadio IIA(T3N0), IIB(T4aN0), 2C(T4bN0);

<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)

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; il prefisso “r” indica i tumori coloretali recidivati dopo un intervallo libero di malattia. I tumori resecati in modo radicale vengono classificati R0, i tumori con margini positivi R1, mentre la persistenza di tumore macroscopico per incompleta resezione viene classificata R2.

Dalle varie caratteristiche del TNM possiamo procedere al raggruppamento in stadi:

<b>Stadio</b>	<b>Descrizione</b>
<b>Stadio 0</b>	Tis N0M0
<b>Stadio I</b>	T1N0M0
	T2N0M0
<b>Stadio IIa</b>	T3N0M0
<b>Stadio IIb</b>	T4aN0M0
<b>Stadio IIc</b>	T4bN0M0
<b>Stadio IIIa</b>	T1-2, N1a-c, M0
	T1, N2a, M0
<b>Stadio IIIb</b>	T3, T4a, N1a-c, M0
	T2-3, N2a, M0
	T1-2, N2b, M0
<b>Stadio IIIc</b>	T4a, N2a-b, M0
	T3, N2b, M0
	T4b, N1-2, M0
<b>Stadio IVa</b>	Ogni T, ogni N, M1a
<b>Stadio IVb</b>	Ogni T, ogni N, M1b

La stadiazione preoperatoria deve iniziare con una visita clinica, con particolare attenzione all'eventuale presenza di ascite, epatomegalia, linfadenopatie, senza mai dimenticare un'adeguata esplorazione rettale. La visita non può prescindere dall'integrazione della diagnostica per immagini, particolarmente importante per lo studio della malattia avanzata e soprattutto nei pazienti affetti da neoplasia rettale, nei quali la stadiazione preoperatoria è propedeutica alla pianificazione della migliore strategia terapeutica, per preservare lo sfintere anale, e ridurre il rischio di recidive locali ed a distanza.

La *TC addome – pelvi* fornisce utili informazioni sulle dimensioni del processo neoplastico, sui rapporti con le strutture vicine, sulla situazione linfonodale, sulla presenza di metastasi (fegato e polmoni) e eventuali complicazioni relative al tumore (ostruzione, perforazione e fistole).<sup>61,62</sup> La sensibilità della TC nell'individuare metastasi a distanza è del 75-85%, del 45-73% nel caso di coinvolgimenti linfonodali, e del 50% nella valutazione dell'invasione trasmurale del tumore. La sensibilità della TC nell'individuazione di linfonodi patologici è più alta nel caso dei tumori del retto più che in quelli del colon.<sup>63</sup> La TC non è un test diagnostico affidabile nel caso di carcinosi peritoneale con noduli tumorali inferiori a 5 mm.<sup>64</sup> La *TC toracica* trova invece indicazione nello studio dell'interessamento polmonare. *L'ecografia addomino-pelvica* è un'indagine a basso costo, 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 con sonda endorettale* che permettono di studiare l'infiltrazione della parete colica, del mesoretto, del plesso venoso e del grasso periviscerale.<sup>65</sup> L'ecografia trans rettale è la migliore indagine per definire il livello di infiltrazione parietale di un carcinoma rettale e per definire con un'accuratezza inferiore, lo stato dei linfonodi regionali. La RMN con sonda endorettale è invece l'esame più accurato per valutare l'invasione perirettale, consentendo di valutare quindi i rapporti anatomici tra retto, vescica ed utero. 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. 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>66</sup> Può trovare impiego per la conferma di risposta complete dopo trattamento e per le individuazioni di sospette recidive. E' indicato valutare la funzionalità midollare, epatica, renale e il bilancio idro-elettrolitico. Vi è indicazione ad effettuare la determinazione del CEA preoperatorio dato il suo ruolo prognostico e il suo possibile utilizzo nel follow -up. Il CEA è un marcatore tumorale che risulta alterato in poco meno della metà dei casi di cancro del colon retto e può risultare alterato in corso di epatite, polmonite e gastroenterite, così come elevati livelli sierici possono essere riscontrati senza che vi sia una patologia sottostante. Questi elementi rendono il test poco specifico per lo screening e la diagnosi di CRC. E' diffusamente impiegato anche il CA 19.9 il cui uso non è tuttavia sostenuto da uguali evidenze.<sup>67</sup>

## **1.8 Cenni di chirurgia**

### *1.8.1 Chirurgia del colon*

La chirurgia di elezione rappresenta il primo e più importante approccio terapeutico con intento curativo per i tumori del colon in stadio I-III; molta importanza è stata attribuita alla valutazione preoperatoria e alla stadiazione. Per ottenere una radicalità oncologica è necessario che il tratto intestinale sede della neoplasia abbia margini di sicurezza sufficientemente ampi, di almeno 10 cm,<sup>66</sup> sia a monte che a valle della lesione, e che la resezione intestinale comprenda il relativo mesentere con le stazioni di drenaggio linfatico distrettuale. Un adeguato campionamento linfonodale è indispensabile per stadiale il tumore e per definire se quel trattamento post-operatorio debba essere somministrato. La linfadenectomia non ha tanto il ruolo di prolungare la sopravvivenza, quanto piuttosto di migliorare l'accuratezza della stadiazione patologica, quindi fornire indicazioni sulla prognosi a distanza del paziente. L'indagine retrospettiva condotta da Sugabaker nel 1982, ha dimostrato che la linfadenectomia estesa è in grado di conferire un moderato vantaggio (5% in termini di sopravvivenza a lungo termine)<sup>68</sup> e ad oggi il numero minimo di linfonodi da reperire nel pezzo operatorio per considerare la linfadenectomia adeguata è di almeno 12 linfonodi. Quindi dal punto di vista pratico, l'intervento chirurgico prevede l'asportazione di almeno 10

cm 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). 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. 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 tecnica "no touch" prevede la legatura precoce dei vasi principali prima di qualsiasi manovra sul colon.<sup>69</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.

L'intervento dei tumori colici può consistere in:

- Emicolectomia dx, che prevede l'asportazione dell'ultima ansa ileale, del cieco, dell'appendice del colon ascendente per i tumori del cieco, del colon ascendente, della flessura epatica e del trasverso prossimale; per quanto riguarda i vasi si procede alla legatura dei peduncoli vascolari ileo colico, colico destro e del ramo destro della colica media;
- Resezione del colon trasverso, con legatura del peduncolo colico medio; in alternativa c'è un crescente consenso (anche in assenza di trials clinici randomizzati) ad eseguire non una resezione segmentaria ma un'emicolectomia destra estesa;
- Emicolectomia sx, che prevede l'asportazione del trasverso distale, della flessura splenica del discendente e del sigma per i tumori che insorgono in tali sedi; per quanto riguarda i vasi si procede alla legatura dei peduncoli vascolari colico sinistro e sigmoideo ed anastomosi coloretale intraperitoneale; 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;

Per le neoplasie del colon destro la linfadenectomia standard deve comprendere i linfonodi ileocolici ed eventualmente il ramo destro dei colici medi, mentre per le neoplasie del colon sinistro e sigma i linfonodi vicini alla radice dell'arteria mesenterica inferiore. L'approccio chirurgico può avvenire sia per via laparotomica convenzionale che per via laparoscopica, con risultati a lungo sovrapponibili, sebbene l'approccio video-laparo assistito sia più vantaggioso in termini di dolore post – operatorio e di tempo di ospedalizzazione. E' fondamentale che le neoplasie coloretali siano trattate da chirurghi con adeguato training ed esperienza.<sup>70</sup>

### 1.8.2 *Chirurgia del retto*

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 viene demandata a centri specialistici e costituisce uno dei momenti terapeutici da valutare nell'ambito di un team multidisciplinare costituito da radiologo, radioterapista, oncologo e chirurgo. Infatti, la strategia terapeutica degli stadi I-III ha lo scopo sia di ridurre l'incidenza delle recidive locali che la preservazione dello sfintere anale. I cardini di questa chirurgia al momento attuale riguardano:

- L'escissione totale del mesoretto;
- Ove possibile la conservazione dell'innervazione simpatica e parasimpatica (nerve sparing technique);



- Il margine di resezione distale e circonferenziale liberi da neoplasia;
- Nelle forme localmente avanzate (T3 – T4 e/o con metastasi linfonodali regionali) l'uso delle terapie neoadiuvanti

Il mesoretto è costituito dal tessuto cellulo-linfo-adiposo 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>71,72</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>72</sup> 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>73,74</sup>

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 mesorettalesso. 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>75</sup>

Gli interventi chirurgici disponibili 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-ano, 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 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).

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 dal 50-85% al 15%. I pazienti con tumore del retto possono avere oggi una buona prognosi e qualità della vita.<sup>76</sup>

### **1.9 Cenni di terapia adiuvante**

La terapia adiuvante consiste nella somministrazione di un trattamento sistemico di tipo chemioterapico dopo che la terapia loco regionale chirurgica abbia ottenuto un controllo della neoplasia primitiva. Si tratta quindi di una cura effettuata in pazienti senza evidenza clinica di malattia ma ad alto rischio di recidiva, con l'intento di eradicare la malattia micrometastatica aumentando la percentuale di guarigione conseguibile con la sola chirurgia. Nel tumore del colon retto la prognosi varia a seconda dello stadio della malattia alla diagnosi: stadio I 90%, stadio II 70-80%, stadio III 40-65% di sopravvivenza a 5 anni. Recenti dati evidenziano come lo stadio T influenzi la prognosi in misura maggiore rispetto allo stadio N e come sia importante nel definire la prognosi il rapporto tra linfonodi

positivi e linfonodi analizzati. La biologia molecolare non apporta una migliore conoscenza sui fattori di rischio di recidiva negli stadi III, anche se alcuni studi suggeriscono una prognosi sfavorevole per i pazienti con malattia *KRAS* mutata sui codoni 12 e 13.<sup>77</sup>

L'uso della chemioterapia sistemica adiuvante in stadio I non trova evidenza in letteratura. L'indicazione terapeutica nello stadio II è controversa e pazienti esposti a 5-Fluorouracile hanno un beneficio assoluto del 3-4%.<sup>78,79</sup> Il trattamento adiuvante nello stadio II può essere considerato nel singolo paziente in presenza dei seguenti fattori prognostici sfavorevoli : occlusione, perforazione, infiltrazione per contiguità degli organi vicini (T4b), Grading G3 (ad eccezione dei tumori con instabilità microsatellitare, MSI-H), inadeguato numero di linfonodi analizzati (<12), presenza di invasione vascolare, linfatica e/o perineurale, più incerto è il valore elevato del CEA preoperatorio. Non vi sono ancora elementi sufficienti per impiegare nella pratica clinica, criteri di stratificazione in base alle caratteristiche biologiche e molecolari anche se la presenza dell'Instabilità Microsatellitare (MSI-H) sembra poter individuare pazienti a migliore prognosi e con diverso effetto della terapia adiuvante (dati ancora controversi sulla possibile resistenza alla terapia con Fluorouracile).<sup>80,81</sup>

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>76</sup> Alla fine degli anni 80' alcuni studi dimostrarono un aumento della sopravvivenza in pazienti trattati con regimi chemioterapici adiuvanti a base di 5FU, in associazione a modulatori dell'attività del Fluorouracile, come Leucovorin (LV) e Levamisolo<sup>82</sup>. Il primo grande trial che ha dimostrato un beneficio in sopravvivenza nei pazienti con tumore del colon trattati con terapia adiuvante, è stato il National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) C-01, che ha randomizzato casualmente 1166 pazienti con cancro del colon in stadio B o C secondo la classificazione di Duke, in 3 bracci: osservazione esclusiva, terapia con 5FU, semustina e vincristina (regime MOF), oppure trattamento con bacillo di Calmette e Guérain (BCG); per la prima volta è stato 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>83</sup> Il North Central Cancer Treatment Group (NCCTG) trial ha randomizzato 401 pazienti con cancro del

colon in stadio B o C secondo la classificazione di Duke a ricevere osservazione, levamisolo da solo oppure levamisolo 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 ( $p = 0.0007$ ).<sup>84</sup> Trials successivi, dimostrando l'inferiorità di 5FU/levamisolo rispetto a FU/Leucovorin, e a causa di maggiori tossicità nel primo, hanno portato ad una importante diminuzione dell'impiego del Levamisolo per la terapia adiuvante. Il levamisolo al momento non è più disponibile in commercio.<sup>85,86</sup>

L'era della moderna terapia adiuvante è stata inaugurata da trials che hanno dimostrato un beneficio in sopravvivenza di 5FU/LV rispetto alla sola chirurgia, dalla superiorità di FU/LV rispetto al regime MOF, dalla possibilità di sostituire il 5FU con una fluoropirimidina orale (capecitabina), dal beneficio dell'aggiunta dell'Oxaliplatino a 5FU/LV.<sup>87</sup>

Tre differenti trials hanno portato a definire il regime FU/LV come standard adiuvante nello stadio III del tumore del colon retto resecato.

- Il NSABP – C03 trial ha dimostrato la superiorità del 5FU più alte dosi di Leucovorin rispetto al regime MOF.
- Un risultato simile al precedente è stato osservato con dosi più basse di Leucovorin nel North Central Cancer Treatment Group (NCCTG) study nel quale 317 pazienti in stadio II ad alto rischio o in stadio III sono stati assegnati casualmente in due bracci: in uno era prevista la semplice osservazione, nel secondo venivano fatti 6 cicli di 5FU ( $425 \text{ mg/m}^2$ ) più LV ( $20 \text{ mg/m}^2$ )  $\times$  5 giorni consecutivi, ripetuto ogni 28 giorni per 6 cicli (schema Mayo Clinic).<sup>88</sup>
- Lo studio IMPACT (International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials) ha messo insieme i dati di 1526 pazienti in stadio B o C secondo la classificazione di Duke, provenienti da tre trials indipendenti, svolti in Italia, Francia e Canada. In tutti i casi i pazienti venivano assegnati casualmente in due bracci: osservazione o sei cicli di FU mensile (da 375 a  $400 \text{ mg/m}^2$ ) più alte dosi di Leucovorin (200 mg al giorno), entrambi somministrati per 5 giorni consecutivi, 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.<sup>89</sup>

L'equiattività di basse dosi rispetto ad alte dosi LV è stata dimostrata in numerosi studi.<sup>90-92</sup> Tuttavia come dimostrato dallo US Intergroup study (INT) 0089 e altri trials, confrontando diversi schemi di somministrazione, come il Mayo Clinic e il Roswell Park regimen (500 mg/m<sup>2</sup> di 5FU e 500 mg/m<sup>2</sup> di AF settimanale x 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 specialmente nelle donne rispetto agli uomini, e gli anziani rispetto ai giovani.<sup>93</sup> Un ulteriore studio ha comparato l'infusione continua di 5FU con il classico trattamento adiuvante e.v. (5FU/LV), dimostrando equiattività del trattamento infusionale e una minore tossicità ematologica e gastrointestinale a prezzo di un maggiore 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>94</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. Almeno tre trials hanno dimostrato l'assenza di benefici di una terapia adiuvante di 12 mesi rispetto ad una dalla durata di 6 – 8 mesi. Non ci sono dati che suggeriscano l'utilizzo di una terapia adiuvante di durata inferiore ai 6 mesi, e al momento le linee guida del National Comprehensive Cancer Network (NCCN) raccomandano sei mesi di terapia adiuvante.<sup>90,91</sup>

La capecitabina (Xeloda), è una fluoro pirimidina orale, assorbita intatta attraverso la parete intestinale e convertita a 5FU in tre reazioni enzimatiche sequenziali. L'enzima finale della catena è rappresentato dalla timidina fosforilasi, la quale è presente a livelli più alti nel tessuto tumorale rispetto ai tessuti normali, presupposto questo per una maggiore selettività tumorale e maggiore tollerabilità della terapia per il paziente. L'European/Canadian X-ACT study ha randomizzato 1987 pazienti con cancro del colon retto in stadio III, in due bracci: in uno i pazienti ricevevano 5FU/LV secondo lo schema Mayo Clinic, nell'altro i pazienti ricevevano

capecitabina, entrambi i trattamenti 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>95</sup>

L'Oxaliplatino è l'unico derivato del platino con attività nel tumore del colon retto. Viene impiegato solo in combinazione con le fluoropirimidine. Il beneficio dell'integrazione di Oxaliplatino a 5FU/LV è stato dimostrato per la prima volta nel MOSAIC trial (Multicenter International study of oxaliplatinum/5 fluorouracile/leucovorin in adjuvant treatment of colon cancer) che ha randomizzato 2246 pazienti con malattia resecata in stadio II (40% dei pazienti) o in stadio III, in due bracci: nel primo i pazienti ricevevano 5FU/LV secondo il regime de Gramont ( LV 200 mg/m<sup>2</sup> per due ore di infusione, seguito da un bolo di 5FU 400 mg/m<sup>2</sup> e poi 22 ore di infusione di 5FU 600 mg/m<sup>2</sup>, ogni 2 settimane); nel secondo braccio i pazienti ricevevano lo stesso regime di 5FU/LV in associazione a Oxaliplatino ( 85 mg/m<sup>2</sup> ogni 14 giorni), regime questo chiamato FOLFOX4. 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 II. 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>96</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>96</sup> Migliori outcomes con oxaliplatino sono stati riportati nello 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>97</sup>, anche se la differenza in overall survival non si è dimostrata statisticamente significativa (sopravvivenza a 5 anni dell' 80% nel braccio FOLFOX e del 78% nel braccio 5FU/LV, HR=0,88). Lo studio XELOXA ha coinvolto 1.886 pazienti reclutati in 226 centri di 29 Paesi. Obiettivo primario del trial era verificare la superiorità del regime XELOX verso 5-FU/LV in termini di DFS a 3 anni. Secondo gli ultimi dati, dopo un follow up mediano di 74 mesi, la DFS era significativamente superiore con XELOX rispetto al bolo di 5FU/LV (HR=0.80 95%CI 0.69-0.93 p=0.03), beneficio quindi che appare sovrapponibile a quello ottenuto con le combinazioni endovenose.<sup>98</sup> Per tale combinazione non vi è ancora dimostrazione di un beneficio in sopravvivenza.<sup>99</sup> Il regime XELOX rispetto al bolo 5FU/LV è associato ad una minore incidenza di neutropenia di grado 3 e 4 (9% vs 16%), neutropenia febbrile (<1% vs 4%), stomatite (<1% vs 9%), e alopecia (4 vs 20%), ma una maggiore neurotossicità (78%vs 8%), una sindrome mano piede di grado 3 ( 5% vs <1%) e un grado 3 o 4 di trombocitopenia ( 5% vs <1%).<sup>100</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>101,102</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>102,103</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>104</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>105</sup> Al di fuori di studi clinici la durata ottimale del trattamento adiuvante è attualmente di 6 mesi.<sup>106</sup>

I farmaci citotossici sono metabolizzati attraverso complessi meccanismi nei quali sono coinvolte diverse attività enzimatiche. Alterazioni degli enzimi deputati al metabolismo degli agenti citotossici che ne determinino una ridotta funzionalità comportano un accumulo del farmaco o di suoi metaboliti attivi con possibile incremento della tossicità. Numerosi studi hanno evidenziato che varianti geniche di enzimi coinvolti nel metabolismo delle fluoropirimidine e dell'irinotecano sono associate ad un più elevato rischio di tossicità. I dati più consistenti presenti ad oggi in letteratura riguardano la diidropirimidina deidrogenasi (DPD), principale enzima del metabolismo delle fluoropirimidine, e l'uridina-glucuronosil-transferasi (UGT) coinvolto nel metabolismo epatico del SN-38, metabolita attivo dell'irinotecano.<sup>107</sup> In particolare, 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 in numerosi studi, sebbene dati discordanti siano presenti in letteratura.<sup>108</sup> Ad esempio, anche se tutti gli studi concordino nel sostenere che pazienti con la variante c.IVS14+1G>A sviluppano tossicità quando trattati con fluoropirimidine, dati discordanti sono stati riportati sulla frequenza dei pazienti con tossicità da fluoropirimidine riconducibile al suddetto polimorfismo (5,5%-29%). Risultati discordanti sono stati pubblicati anche per la frequenza del polimorfismo c.2846A>T. Per quanto riguarda l'UGT, la variante allelica UGT1A1\*28 è associata a ridotto metabolismo dell'irinotecano. Numerosi studi hanno rivelato che pazienti con tale variante vanno incontro più frequentemente a tossicità ematologica e diarrea. Tuttavia, il rischio di tossicità è dose-dipendente ed in genere non osservato a dosi <150 mg/m<sup>2</sup>.<sup>109</sup> Una riduzione di dosi è comunque raccomandata in soggetti omozigoti per la variante UGT1A1\*28. Infine, studi di farmacogenetica hanno anche suggerito che soggetti portatori dell'allele wild-type UGT1A1\*1 potrebbero tollerare dosi più elevate di irinotecano e questo potrebbe determinare un migliore risultato terapeutico.<sup>110</sup> Le analisi farmacogenetiche (DPD per le fluoropirimidine e UGT1A1\*1/\*28) possono essere considerate: 1. In pre-terapia ogni qual volta, a giudizio dell'oncologo, il trattamento venga proposto per un



paziente in cui per le caratteristiche cliniche (comorbidità, PS, stadio di malattia) sia elevato il rapporto rischio/beneficio. 2. Durante la terapia, nei casi di tossicità gastrointestinale di grado  $\geq 3$  o ematologica di grado 4 e nei casi di tossicità inattesa.

### **1.10 Cenni di terapia neoadiuvante**

Il carcinoma del retto si presenta in forma localmente avanzata (interessamento di parete a tutto spessore e/o coinvolgimento linfonodale, cT3/4 e/o N pos) nel 60 % circa dei casi. In questi pazienti il solo trattamento chirurgico è associato ad un alto rischio di ripresa di malattia a livello pelvico. La radioterapia preoperatoria nel cancro del retto extraperitoneale è associata ad una significativa riduzione delle recidive locali, con un indice terapeutico superiore rispetto al trattamento postoperatorio, indipendentemente dal regime impiegato (frazionamento convenzionale con 25/28 frazioni di 1.8/2.0 Gy o ipofrazionamento con 5 frazioni da 5.0 Gy). Quando la radioterapia è stata eseguita con frazionamento tradizionale in associazione con chemioterapia concomitante e con dosi superiori ai 30 Gy e con un intervallo di 6/8 settimane prima della chirurgia si è rilevata una riduzione statisticamente significativa dell'incidenza di recidive locali<sup>111</sup> con tassi di risposte complete patologiche del 10-15% ed un possibile impatto positivo sulla possibilità di interventi chirurgici conservativi dello sfintere, pur non essendo disponibile a tutt'oggi uno studio che ne stimi con precisione il reale vantaggio.<sup>112</sup> Due studi randomizzati europei hanno inoltre direttamente dimostrato il vantaggio in controllo locale e risposte patologiche nei pazienti trattati con radiochemioterapia preoperatoria, con l'impiego di 5FU e acido folinico in associazione alla radioterapia, rispetto a quelli trattati con sola radioterapia preoperatoria convenzionale.<sup>111,113</sup> La chemioradioterapia preoperatoria costituisce quindi il trattamento di riferimento per il cancro del retto localmente avanzato. Nonostante i risultati promettenti di numerosi studi di fase II, 4 studi randomizzati relativi ad associazioni di radioterapia con 5-FU/LV e oxaliplatino, non hanno mostrato vantaggi in termini di risposte patologiche complete evidenziando invece aumento di tossicità rispetto al solo 5FU/acido folinico.<sup>114</sup> I primi dati sul follow-up disponibili per lo studio francese non evidenziano inoltre nessun vantaggio neppure in termini di controllo locale e DFS.<sup>115</sup> L'associazione tra radioterapia e polichemioterapia in pazienti con tumori localmente avanzati ed assenza di

metastasi a distanza non trova quindi indicazione nella pratica clinica. La somministrazione orale di capecitabina si è invece dimostrata equivalente al 5-fluoruracile in infusione continua con il vantaggio di evitare il posizionamento di cateteri venosi centrali.<sup>116</sup> Al fine di rendere massimi gli effetti della terapia neoadiuvante, tra il termine del trattamento chemio-radiante e la chirurgia devono intercorrere non meno di 6 settimane e non più di 8-10 settimane. In caso di adeguata stadiazione con RM effettuata da radiologi dedicati, in presenza di limitato coinvolgimento transmurale ed in assenza di coinvolgimento linfonodale nei pazienti con tumori del retto medio la chirurgia upfront potrebbe essere valutata dopo attenta discussione multidisciplinare e può rappresentare un'opzione da discutere con il paziente.<sup>117</sup>

Il ruolo della chemioterapia adiuvante post-operatoria nei pazienti sottoposti a chemio-radioterapia prima della chirurgia rimane oggetto di dibattito. I dati degli studi sul trattamento postoperatorio (anche se datati e provenienti da studi relativamente piccoli) e i dati dello studio di confronto tra chemioradioterapia pre e post-operatoria tuttavia indicano che un trattamento chemioterapico della durata complessiva di 6 mesi dovrebbe far parte del programma di trattamento integrato per il carcinoma del retto localmente avanzato.<sup>118</sup> Dati recenti pubblicati su *Lancet Oncology*, indicano invece che, in pazienti con malattia residua transmurale e/o persistenza di coinvolgimento linfonodale dopo chemioradioterapia a base di fluoropirimidine, l'impiego di un regime contenente oxaliplatino (FOLFOX) determina un miglioramento della sopravvivenza libera da malattia a tre anni rispetto ad un trattamento adiuvante con fluoropirimidine in monoterapia con alta compliance e buona tolleranza. Questo studio (ADORE), pur su una popolazione di pazienti limitata, con un disegno di fase II che non consente formali conclusioni comparative e con dati sulla sopravvivenza globale, al momento, non ancora maturi, fornisce quindi la prima evidenza diretta che supporta l'impiego di oxaliplatino (FOLFOX) nel trattamento adiuvante del cancro del retto dopo chemioradioterapia preoperatoria. Questo risultato può dipendere anche dalla selezione di pazienti con scarsa risposta alla chemioradioterapia (stadio patologico II o III dopo chemioradioterapia) effettuata in questo studio suggerendo che il trattamento adiuvante dopo chemioradioterapia deve essere modulato anche sulla base della risposta al precedente trattamento neoadiuvante. Ulteriore evidenza a supporto dell'impiego di FOLFOX nel trattamento adiuvante del cancro

del retto dopo chemioradioterapia con fluoropirimidine è provveduta anche dallo studio AIO-04 presentato lo scorso anno all'ASCO che ha evidenziato un vantaggio statisticamente significativo in DFS a 3 anni nel braccio FOLFOX rispetto al braccio con FU/LV. La minor magnitudine del vantaggio rispetto allo studio ADORE può essere ascritta all'assenza di selezione per qualità della risposta al trattamento preoperatorio.

Nell'insieme questi dati supportano in modo diretto l'impiego di uno schema postoperatorio che comprenda una fluoropirimidina associata ad oxaliplatino, finora utilizzato solo sulla base di estrapolazioni dai dati sul carcinoma del colon, nei pazienti con chiara positività linfonodale alla stadiazione clinica iniziale e/o alla stadiazione patologica e nei pazienti con scarsa risposta alla chemioradioterapia pre-operatoria.<sup>119</sup> L'impiego e la scelta del regime di chemioterapia post-operatoria nei pazienti chemioradiotrattati deve comunque continuare ad essere oggetto di valutazione multidisciplinare che tenga in considerazione lo stadio iniziale e la risposta patologica. Ancora più complessa è peraltro la definizione dell'utilità della chemioterapia post-operatoria sulla base del grado di risposta al trattamento preoperatorio. I dati che sembravano dimostrare un effetto differenziale di un trattamento adiuvante con solo 5-fluorouracile/ acido folinico con un vantaggio in DFS ed OS osservato solo nei pazienti in cui si veniva ottenuto un down-staging non sono stati infatti confermati ad una recente analisi aggiornata. E' inoltre particolarmente dibattuto il ruolo della chemioterapia adiuvante nei pazienti che ottengono una risposta patologica completa, particolarmente in assenza di metastasi linfonodali alla stadiazione clinica iniziale. L'uso di nomogrammi potrebbe favorire la quantificazione del beneficio della chemioterapia adiuvante e aiutare la decisione clinica, come proposto recentemente da una pooled analysis dei recenti studi randomizzati europei.<sup>120</sup>

## **Capitolo 2. Malattia metastatica**

### **2.1 Introduzione**

I pazienti con malattia metastatica (stadio IV) rappresentano circa il 25% delle nuove diagnosi di carcinoma coloretale, a cui si somma un ulteriore 25% di pazienti, che trattati con intento curativo svilupperanno, nel corso della loro storia, una malattia metastatica.<sup>121,122</sup> La sopravvivenza mediana dei pazienti affetti da cancro coloretale metastatico (mCRC) è notevolmente aumentata negli ultimi 20 anni, passando da 12 mesi nell'era in cui il fluorouracile (5FU) rappresentava lo standard di cura, a oltre 30 mesi secondo i dati di studi recentemente pubblicati.<sup>123</sup> Tali risultati sono stati possibili grazie al miglioramento della strategia terapeutica sia farmacologica che chirurgica delle metastasi, nonché ad una selezione più accurata di pazienti sulla base di criteri clinici e molecolari. L'introduzione nella pratica clinica di agenti chemioterapici dimostratesi attivi (oxaliplatino e irinotecano e il più recente TAS-102) e la scoperta di "target therapies" o farmaci a bersaglio molecolare (antiangiogenici e anticorpi monoclonali anti-EGFR), hanno rivoluzionato il trattamento di questa malattia. Se è vero che gli obiettivi della terapia restano la palliazione dei sintomi, il prolungamento della sopravvivenza e il miglioramento della qualità della vita, in alcuni casi selezionati è possibile perseguire la guarigione, tanto che la dove ve ne sia l'indicazione, accanto alla terapia sistemica trovano spazio trattamenti chirurgici e locoregionali (radioterapia stereotassica, termoablazione e radioembolizzazione). Oggi il trattamento della malattia avanzata non può prescindere dall'analisi delle caratteristiche molecolari dei tumori coloretali, che possono fornire indicazioni predittive e prognostiche utili per impostare la terapia più appropriata per ogni singolo paziente.

### **2.2 Chemioterapia**

I farmaci citotossici sono il cardine del trattamento dei pazienti affetti da mCRC. Per decenni l'unico farmaco disponibile per il trattamento di questa patologia è stato il 5FU in monoterapia. A partire dagli anni '90 il panorama dei farmaci citotossici si è ampliato con l'introduzione nella pratica clinica di irinotecano e oxaliplatino, studiati prima in associazione al 5FU nelle doppiette FOLFIRI e FOLFOX e successivamente utilizzati in maniera concomitante (FOLFOXIRI).<sup>124</sup> Alcuni studi hanno poi valutato il ruolo della capecitabina da sola o in associazione con gli altri citotossici, trovando uno spazio nel trattamento della

malattia metastatica.<sup>125</sup> La combinazione 5FU e irinotecano in prima linea è stata valutata in uno studio multicentrico europeo in cui 387 pazienti con mCRC non precedentemente trattati con chemioterapia, sono stati randomizzati a ricevere FOLFIRI (n=199) o 5FU/LV (n=188). Gli obiettivi primari erano il Response Rate (RR) e la Progression Free Survival (PFS). Il gruppo trattato con FOLFIRI ha mostrato un incremento significativo del RR (49% vs 31%,  $p < 0.001$  nei pazienti valutabili), della PFS mediana (6.7 vs 4.4 mesi,  $p < 0.001$ ) e della sopravvivenza mediana (17.4 vs 14.1 mesi,  $p = 0.031$ ) rispetto a quelli trattati nel braccio di controllo. Le tossicità di grado 3 e 4 (diarrea e neutropenia) sono state significativamente più frequenti nel gruppo con irinotecano ma risultavano comunque reversibili, non cumulative e facilmente gestibili dal punto di vista clinico.<sup>126</sup> La combinazione di oxaliplatino e 5FU/LV è stata invece inizialmente investigata in uno studio in cui 420 pazienti con mCRC non precedentemente trattati, sono stati randomizzati a ricevere 5FU/LV o FOLFOX4. I pazienti trattati con FOLFOX4 hanno avuto un RR (endpoint primario) significativamente più alto (51% vs 22%,  $p = 0.0001$ ), così come la PFS (9 vs 6.2 mesi,  $p = 0.0003$ ) e l'OS mediana (16.2 vs 14.7 mesi,  $p = 0.12$ ); neutropenia di grado 3 e 4 (42% vs 5%) e diarrea (12% vs 5%) sono state più frequenti con oxaliplatino.<sup>127</sup> In conclusione questi studi hanno dimostrato che l'associazione di 5FU/LV con irinotecano o oxaliplatino migliora in modo significativo l'outcome dei pazienti con mCRC al prezzo di tossicità maneggevoli. Successivamente in uno studio di fase III, il Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale (GOIM) ha valutato l'efficacia della terapia in prima linea con regime FOLFIRI (braccio A) vs FOLFOX4 (braccio B) in 360 pazienti con mCRC; l'ORR è stato del 31% (95% CI, 24.6%-38.3%) vs 34% (95% CI, 27.2%-41.5%)  $p = 0.60$ , il tempo medio alla progressione di 7 mesi vs 7 mesi ( $p = 0.64$ ) e la OS mediana di 14 vs 15 mesi rispettivamente ( $p = 0.28$ ). Questi dati hanno dimostrato una sostanziale equivalenza nell'efficacia tra i due schemi di trattamento in prima linea; le uniche differenze hanno riguardato il profilo di tossicità, con mucosite, alopecia e nausea più frequenti nel braccio con irinotecano, trombocitopenia e neurotossicità più comuni nel gruppo con oxaliplatino.<sup>128</sup> Un risultato simile è stato ottenuto in uno studio francese del Group Cooperatur Multidisciplinaire en Oncologie (GERCOR) che ha confrontato una strategia terapeutica che prevedeva FOLFIRI seguito 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>129</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 cliniche (comorbidità, rischio di tossicità, condizioni di salute generale) e delle preferenze del paziente. Due trials randomizzati simili (con 602 e 605 pazienti, rispettivamente) hanno dimostrato come la monoterapia con capecitabina sia sovrapponibile in termini di efficacia a 5FU/LV (regime Mayo Clinic) nella terapia di prima linea del mCRC. In uno di questi la capecitabina ha mostrato un modesto ma significativo aumento del RR rispetto a 5FU/LV (25% vs 16%,  $p=0.005$ ), ma un tempo medio alla progressione (4.3 vs 4.7 mesi,  $p=0.72$ ) e sopravvivenza totale (12.5 vs 13.3 mesi,  $p=0.974$ ) simili nei due regimi. L'incidenza di diarrea di grado 3 e 4, stomatite e nausea è risultata inferiore nel gruppo trattato con capecitabina ( $p < 0.0001$ ); soltanto l'iperbilirubinemia e la sindrome mano – piede sono stati più comuni nei pazienti trattati con capecitabina ( $p < 0.00001$ ).<sup>125</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, specialmente nei soggetti nei quali la terapia infusionale non è desiderata o fattibile. Tossicità di grado 3 – 4 come trombocitopenia (HR = 2.07, 95% CI, 1.42 - 3.03,  $p < 0.0002$ ), diarrea (HR = 1.34; 95% CI, 1.08 - 1.66,  $p < 0.0009$ ) e sindrome mani – piedi di grado 2 – 3 (HR = 3.54; 95% CI, 2.07 to 6.05,  $p < 0.00001$ ) sono state meno importanti nei regimi contenenti 5FU sebbene l'incidenza di neutropenia (HR = 0.15, 95% CI, 0.11 to 0.19,  $p < .00001$ ) sia stata più bassa nei regimi contenenti capecitabina.<sup>130</sup>

L'associazione di capecitabina e irinotecano è stata inizialmente valutata nello studio di non inferiorità EORTC che ha arruolato 85 pazienti nei quali venivano confrontati gli schemi XELIRI e FOLFIRI. Lo studio è stato precocemente chiuso a causa di 8 decessi legati alla terapia, pertanto non si è arrivati a delle conclusioni definitive.<sup>131</sup>Lo studio di fase III BICC-C ha confrontato tre differenti approcci di

combinazione di irinotecano con una fluoropirimidina (infusione di 5FU ovvero FOLFIRI, bolo di 5FU ovvero IFL, capecitabina orale ovvero schema XELIRI)<sup>132</sup>. FOLFIRI si è dimostrato essere il regime migliore sia in termini di efficacia che di tollerabilità; XELIRI è risultato associato ad un aumento significativo, rispetto a FOLFIRI di eventi avversi di grado 3 e 4 come diarrea (48% vs 14%), nausea (18 vs 9%), vomito (16% vs 9%), e disidratazione (19% vs 6%). Nel complesso, questi studi suggeriscono cautela nell'impiego della capecitabina con Irinotecano, preferendo in tale combinazione la fluoropirimidina infusione, mentre non sussistono particolari indicazioni nella scelta tra capecitabina o 5FU quando il regime è a base di oxaliplatino, data l'equivalenza dei due farmaci in termini di efficacia.

Osservazioni cliniche retrospettive provenienti da diversi studi, hanno chiaramente dimostrato come l'utilizzo di tutti e tre gli agenti citotossici attivi nel corso della storia naturale della malattia, determini un miglioramento dell'outcome dei pazienti con mCRC, sia in termini di PFS che di OS. Questo è quanto emerso dal sopracitato studio GERCOR, che ha mostrato un beneficio in sopravvivenza nei pazienti che hanno ricevuto 5FU, oxaliplatino e irinotecano nel corso del trattamento, indipendentemente dall'ordine di somministrazione.<sup>129</sup> Tale osservazione è stata ulteriormente confermata da un'analisi combinata di sette studi di fase III, in cui i pazienti esposti in modalità concomitante o sequenziale a tutti e tre i farmaci attivi godevano di un significativo vantaggio in termini di OS rispetto a chi non li riceveva.<sup>133</sup> Contemporaneamente anche promettenti studi preclinici<sup>134</sup> hanno mostrato una potenziale attività sinergica dei tre citotossici su linee cellulari di CRC. Sulla base di tali presupposti, alla fine degli anni 90' Falcone et al. hanno condotto studi di fase I e II per valutare la fattibilità, l'attività e il profilo di sicurezza della combinazione di 5FU, irinotecano e oxaliplatino (FOLFOXIRI) in 42 pazienti con mCRC non precedentemente trattati.<sup>135-137</sup> Le tossicità di grado 3-4 più rilevanti sono state diarrea (21%) e neutropenia (55%). Il regime di combinazione si è mostrato molto attivo con un tasso di risposte obiettive del 71.4%, inoltre il 26% dei pazienti sono stati sottoposti a resezione radicale delle metastasi. La PFS e la OS erano rispettivamente di 10.4 e di 26.5 mesi. A tale esperienza preliminare ha fatto seguito nel 2002 un ulteriore studio di fase II in cui è stato sviluppato un regime di associazione con la tripletta FOLFOXIRI in schedula modificata, con riduzione di dose di irinotecano e oxaliplatino, infusione

continua in 48 ore di 5FU, senza somministrazione in bolo, al fine di ridurre la tossicità gastroenterica ed ematologica. In questo studio, avente come end-point primario il RR, è stata confermata l'attività precedentemente riportata della tripletta (ORR=72%), con un tasso di resezione radicale delle metastasi post-chemioterapia del 25%, una mPFS di 10.8 mesi e una mOS di 28.4 mesi.<sup>138</sup> A seguito di questi promettenti risultati il Gruppo Oncologico del Nord-Ovest (GONO) ha condotto uno studio multicentrico di fase III che ha randomizzato 244 pazienti con malattia metastatica non resecabile a ricevere un trattamento di prima linea con FOLFIRI o FOLFOXIRI. Il tasso di risposte (end-point primario) è stato del 34% nel braccio con FOLFIRI rispetto al 60% nel braccio con FOLFOXIRI ( $p < 0.0001$ ) mentre 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. Altro dato importante che è emerso è che il tasso di resezioni secondarie R0 delle metastasi, è stato maggiore nel braccio con FOLFOXIRI rispetto a FOLFIRI sia nella popolazione generale (15% vs 6%,  $p = 0.033$ ) sia nei pazienti con sole metastasi epatiche (36% vs 12%  $p = 0.017$ ). Dal punto di vista della safety, nei pazienti trattati con tripletta è stata registrata una percentuale maggiore di neurotossicità periferica di grado 2 e 3 (0% vs 19%,  $p < 0.001$ ) e di neutropenia (50% vs 28%,  $p < 0.001$ ). 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. In conclusione sulla base di questi risultati possiamo affermare che FOLFOXIRI in prima linea incrementa significativamente il RR, la PFS, e la OS rispetto al FOLFIRI, con un profilo di tossicità maneggevole.<sup>139</sup> Risultati meno incoraggianti sulla tripletta sono stati invece ottenuti da uno studio greco di fase III condotto da Souglakos et al. dell'Hellenic Oncology Research Group (HORG), che ha randomizzato 283 pazienti con mCRC non precedentemente trattati, a ricevere FOLFOXIRI (n=137) o FOLFIRI (n=146). Non sono state osservate differenze significative tra i due bracci con FOLFOXIRI e FOLFIRI rispettivamente, in termini di OS mediana (21.5 vs 19.5 mesi,  $p = 0.337$ ), di tempo medio alla progressione (TTP, 8.4 vs 6.9 mesi,  $p = 0.17$ ) e RR (43% vs 34%,  $p = 0.168$ ). Ci sono tuttavia due punti importanti che permettono di spiegare il motivo di risultati così differenti da quelli ottenuti dal GONO. Innanzitutto la schedula adottata dall'HORG includeva la somministrazione di 5FU in bolo (più tossica), e dosi significativamente inferiori di



oxaliplatino e irinotecano rispetto a quelle utilizzate dal GONO; inoltre la popolazione di pazienti arruolata nello studio ellenico comprendeva anche anziani con età superiore ai 75 anni e pazienti con un peggiore ECOG performance status (PS), dunque a maggior rischio di tossicità (mentre nello studio GONO il limite di età era di 75 anni e pazienti tra i 70 e i 75 dovevano avere un ECOG PS 0).<sup>140</sup>

Proseguendo con i farmaci citotossici, l'ultimo entrato a far parte dell'armamentario dei farmaci attivi nel mCRC è TAS-102. Si tratta di un nuovo farmaco nucleosidico per via orale, costituito da due componenti, l'agente citotossico trifluorotimidina FTD, un antimetabolita che dopo un'attivazione enzimatica all'interno delle cellule tumorali, viene incorporato direttamente nel DNA inducendone la rottura, e dall'inibitore della timidina fosforilasi tipiracil cloridrato (TPI), enzima che degrada in gran parte l'FTD quando viene assunto per os; in questa maniera TPI inibisce il metabolismo della trifluorotimidina aumentandone la biodisponibilità, mostrando inoltre proprietà antiangiogeniche.<sup>141</sup> L'efficacia del farmaco è stata dimostrata in uno studio giapponese di fase II che ha randomizzato 172 pazienti con mCRC refrattario ai trattamenti, a ricevere TAS-102 o placebo. L'OS (end – point primario) è stata significativamente più alta nel braccio con TAS 102 rispetto al placebo (9.0 vs 6.6 mesi, HR=0.56, p=0.0011). Sulla base di questi risultati il farmaco è stato approvato in Giappone.<sup>142</sup> Lo studio multicentrico di fase III RECOURSE, a cui hanno partecipato 114 centri di 13 paesi in tutto il mondo, ha arruolato circa 800 pazienti che avevano un cancro coloretale metastatico dimostratosi refrattario a tutte le terapie standard, tra cui fluoropirimidine, oxaliplatino, irinotecano, bevacizumab, e cetuximab o panitumumab (per i pazienti con tumori *KRAS* wild-type). I pazienti sono stati randomizzati (2:1) a ricevere TAS-102 (534 pazienti) o placebo (266 pazienti), in entrambi i casi in combinazione con la migliore terapia di supporto disponibile; l'end-point primario era la sopravvivenza globale.<sup>143</sup> Lo studio ha dimostrato che TAS-102 prolunga in modo significativo l'OS rispetto al placebo (mOS= 7.1 vs 5.3 mesi, HR= 0,68, 95% CI 0.58-0.81, P < 0,0001). Inoltre, TAS-102 si è dimostrato superiore al placebo anche dal punto di vista della PFS (2.0 vs 1.7 mesi, HR=0,48, p < 0,0001) e del disease control rate (44% vs 16%, p<0.001); 8 pazienti trattati con TAS-102 hanno avuto una risposta parziale obiettiva mentre un paziente nel gruppo trattato con placebo ha avuto una risposta completa (RR 1,6 % vs 0.4 %, p=0.29). Eventi avversi di grado 3 o 4 sono stati riportati più frequentemente nel

gruppo che ha ricevuto TAS-102 rispetto al placebo (69% vs 52%). Nel gruppo trattato con TAS-102 gli eventi avversi più comuni sono stati neutropenia (38% vs <1), la leucopenia (21% vs 5%), anemia (18% vs 3%) e neutropenia febbrile (4% vs 0%). Un paziente è deceduto per shock settico verificatosi a seguito del trattamento. Sono state riportate anche tossicità gastrointestinali di grado 1 e 2, raramente di grado 3. Sulla base di questi risultati, TAS 102 è stato approvato nel settembre 2015 dalla Food and Drug Administration (FDA) per il trattamento dei pazienti con mCRC precedentemente trattati con fluoropirimidine, oxaliplatino, irinotecano, bevacizumab, e cetuximab o panitumumab per i pazienti con tumori RAS wild-type.

### **2.3 Farmaci a bersaglio molecolare**

Negli ultimi venti anni si è assistito ad un' esplosione delle conoscenze nel campo della biologia tumorale che hanno permesso lo sviluppo di terapie target in grado di agire su specifici bersagli molecolari. I pazienti con mCRC hanno potuto così beneficiare di nuovi agenti farmacologici in grado di modificarne significativamente l'outcome. Sono due le classi di farmaci a bersaglio molecolare attualmente impiegati nel tumore coloretale: i farmaci antiangiogenici e gli anticorpi monoclonali anti-EGFR.

#### **2.3.1 Farmaci antiangiogenici**

Tanto le cellule normali, quanto quelle tumorali necessitano di una vascolarizzazione che garantisca una disponibilità di ossigeno e sostanze nutritive sufficienti alla crescita e al mantenimento dei tessuti. Il fattore fondamentale che regola il processo fisiologico di angiogenesi è il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), scoperto da Napoleone Ferrara nel 1989.<sup>144</sup> L'angiogenesi mediata dal VEGF rappresenta uno dei meccanismi principali attraverso il quale, in condizioni fisiologiche, avviene il controllo del livello di vascolarizzazione dei tessuti. Analogamente il processo di angiogenesi è una fase essenziale nello sviluppo e progressione del cancro, ed il VEGF svolge un ruolo cruciale nell'accrescimento della maggior parte dei tumori primari e del successivo processo di metastatizzazione. In molti tumori umani, tra i quali quelli coloretali, si osserva una sovraregolazione del VEGF e dei suoi recettori. Tra i fattori proangiogenici 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. Anticorpi che legano e neutralizzano il VEGF sono stati impiegati in pazienti con malattia coloretale metastatica<sup>145</sup>; la maggior parte delle informazioni attualmente disponibili derivano dall'anticorpo monoclonale umanizzato anti-VEGF-A bevacizumab, che riconosce e inibisce tutte le isoforme di VEGF-A. Sulla base della sua efficacia nel tumore del colon retto avanzato, bevacizumab è stato il primo farmaco inibitore dell'angiogenesi ad essere approvato, estendendo progressivamente le sue indicazioni terapeutiche a molte altre neoplasie solide. Oltre agli effetti antiangiogenici, bevacizumab, riducendo la pressione interstiziale a livello del tumore permette anche una migliore diffusione della chemioterapia nelle sedi bersaglio.<sup>146,147</sup> Al momento, biomarkers in grado di predire in maniera affidabile l'efficacia clinica di bevacizumab non sono stati ancora identificati.<sup>147</sup> Bevacizumab è un farmaco in generale piuttosto maneggevole. Tra gli eventi avversi più frequenti troviamo ipertensione, sanguinamenti, proteinuria e più raramente sindrome nefrosica, perforazione del tratto GI e eventi trombotici sia sul versante arterioso che venoso.<sup>148</sup> Si rendono quindi necessari periodici controlli delle urine per valutare la proteinuria<sup>149</sup> e un monitoraggio attento della pressione arteriosa. Bevacizumab dovrebbe essere interrotto almeno 5 settimane prima e dopo un intervento chirurgico programmato, data la sua lunga emivita (20 giorni).

Il concomitante utilizzo di bevacizumab insieme ai chemioterapici di prima linea migliora l'outcome dei pazienti. Da un'analisi pooled di sette studi che confrontavano l'uso della chemioterapia con o senza bevacizumab nella terapia di prima linea, si è potuto osservare che la somministrazione di bevacizumab è associata ad una riduzione del 19% del rischio di morte (HR=0.81, 95% CI 0.46-0.73), e ad un vantaggio in OS mediana di due mesi (18.7 vs 16.1, HR=0.80, 95%CI 0.71-0.90, p = .0003 ); anche la PFS risulta migliore (HR=0.58, 95% CI 0.46-0.73). e il vantaggio di circa due mesi (9.1 vs 6.9, p = 0.0003 ).<sup>150</sup> Il beneficio dell'associazione di bevacizumab con irinotecano è stato inizialmente dimostrato in uno studio di 813 pazienti che sono stati randomizzati a ricevere una prima linea a base di irinotecano e 5FU (schema IFL) con o senza bevacizumab. 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). A seguito della pubblicazione di questi dati bevacizumab ha ricevuto un ampio consenso negli USA nel trattamento di prima linea del mCRC fino alla sua approvazione dall'FDA nel 2004.<sup>151</sup>

Lo studio NO 16966 ha valutato l'efficacia e la sicurezza di bevacizumab quando questo viene aggiunto a una prima linea a base di XELOX o FOLFOX4 in 1401 pazienti con mCRC. La PFS mediana, obiettivo primario dello studio, è stata di 9.4 mesi nel braccio con bevacizumab e 8.0 mesi nel braccio con placebo (HR=0.83 97.5%CI 0.72-0.95 p=0.0023). L'OS mediana è stata di 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 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>152</sup>

Bevacizumab è stato studiato anche in combinazione a 5FU/LV e capecitabina in quei pazienti che non potevano ricevere una doppietta terapeutica. Uno studio del 2005 ha valutato 241 pazienti trattati con 5FU/LV rispetto a 249 pazienti trattati con 5FU/LV/bevacizumab ogni 2 settimane (5mg/Kg ogni 2 settimane). La sopravvivenza mediana è stata di 17.9 mesi nel gruppo 5FU/LV/bevacizumab rispetto ai 14.6 mesi del gruppo di controllo (HR=0.74, p= .008), mentre la PFS è stata di 8.8 mesi nel gruppo FU/LV/bevacizumab, rispetto ai 5.6 mesi del gruppo di controllo (HR=0.63, p < 0.001). L'aggiunta di bevacizumab migliorava anche il RR (34.1% vs 24.5%, p=0.019)<sup>153</sup>; un altro studio di fase III pubblicato lo stesso anno ha fornito risultati simili.<sup>154</sup>

L'attività e la sicurezza della tripletta FOLFOXIRI più bevacizumab sono state invece testate dal gruppo GONO nello studio di fase II FOIB<sup>155</sup>, nel quale 57 pazienti con mCRC non resecabile sono stati sottoposti a FOLFOXIRI in associazione a 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 controllo della malattia (100%). La PFS a 10 mesi (end-point primario) è stata del 74% (95% CI 62-85). I principali effetti collaterali di grado 3-4 sono stati neutropenia (49%) e diarrea (14%), con un profilo di

sicurezza paragonabile a quello ottenuto con il solo FOLFOXIRI, confermando che le tossicità relative alla chemioterapia non erano incrementate dall'aggiunta dell'anticorpo. Sulla base di questi promettenti risultati è stato condotto lo studio TRIBE che ha randomizzato 508 pazienti con mCRC non precedentemente trattati a ricevere FOLFIRI più bevacizumab (gruppo di controllo) o FOLFOXIRI più bevacizumab. Sono stati somministrati 12 cicli di FOLFOXIRI più bevacizumab e a seguire 5FU più bevacizumab fino alla progressione della malattia. Il RR è stato del 65.1 % nel braccio sperimentale rispetto al 53.1% nel braccio di controllo (ORR 1.64, 95% CI 1.15-2.35,  $p=0.006$ ). La PFS, obiettivo primario dello studio, ad un follow up di 32.2 mesi, è stata di 12.1 mesi nel gruppo sperimentale, rispetto ai 9.7 mesi del gruppo di controllo (HR=0.75 95%CI 0.62-0.90,  $p=0.003$ ). Nel braccio in cui si è utilizzata la tripletta si è avuto un aumento dell'incidenza di neurotossicità di grado 3 e 4 (5.2% vs 0%,  $p<0.001$ ), stomatite (8.8% vs 4.3%,  $p=0.048$ ), diarrea (18.8% vs 10.6%,  $p=0.01$ ) e neutropenia (50% vs 20.50%,  $p<0.001$ ), mentre nessuna differenza significativa in termini di neutropenia febbrile, incidenza di eventi avversi di grado 3-4 e morti legate al trattamento sono state osservate. Per quanto riguarda il tasso di chirurgie radicali delle metastasi, la tripletta non determina un aumento delle resezioni R0 (12% nel braccio di controllo vs 15% in quello sperimentale,  $p=0.33$ ).<sup>123</sup> Questo può essere spiegato dall'alto numero di pazienti con metastasi multiple e dalla bassa percentuale di pazienti con sole metastasi epatiche. Ad un recente aggiornamento, dopo un follow up mediano di 48.1 mesi, si è registrato un vantaggio significativo, a favore del braccio sperimentale, anche in termini di OS 29.8 vs 25.8 mesi (HR=0.80, 95%CI 0.65-0.98  $p=0.030$ ) indipendentemente dallo stato mutazionale di *RAS* e *BRAF*. Il tasso di sopravvivenza a 5 anni si è dimostrato doppio nel braccio FOLFOXIRI + bevacizumab rispetto al braccio FOLFIRI + bevacizumab (24.9% vs 12.4%), sottolineando l'efficacia di tale schema anche nella sopravvivenza a lungo termine.<sup>156</sup>

L'efficacia di bevacizumab in seconda linea dopo il fallimento di una prima linea contenente bevacizumab (beyond progression) è stata indagata in due studi. Nello studio europeo TML (ML 18147), 820 pazienti con mCRC progrediti dopo aver ricevuto una prima linea di chemioterapia con bevacizumab sono stati randomizzati a ricevere una fluoropirimidina con o senza bevacizumab. La PFS è stata di 5.7 mesi nel braccio con chemioterapia e bevacizumab rispetto a 4.1 mesi

nel braccio con la sola fluoropirimidina (HR= 0.68, 95% CI 0.59–0.78,  $p < 0.0001$ ), OS, end-point primario, è stata rispettivamente di 11.2 e 9.8 mesi (HR=0.81, 95% CI 0.69–0.94,  $p = 0.0062$ ); gli eventi avversi relativi a bevacizumab erano in linea con i dati di letteratura. Un numero maggiore di pazienti ha potuto beneficiare di un migliore controllo della malattia nel braccio con bevacizumab (68% VS 54%,  $p < 0.0001$ ), mentre il RR è stato simile in entrambi i bracci (5.4% vs 3.9,  $p = 0.31$ ). Sulla base di questi risultati, nel gennaio 2013, l'FDA ha approvato l'uso di bevacizumab in associazione a una chemioterapia contenente una fluoropirimidina-irinotecano o una fluoropirimidina-oxaliplatino nel trattamento di seconda linea dei pazienti con mCRC progrediti ad una prima linea contenente bevacizumab.<sup>157</sup> Similmente lo studio di fase III BEBYP del GONO ha randomizzato 185 pazienti che avevano già ricevuto una prima linea contenente una fluoropirimidina più bevacizumab, a ricevere una seconda linea a base di FOLFOX-6 o FOLFIRI con o senza bevacizumab. In considerazione dei risultati dello studio TML appena citato, il trial è stato prematuramente chiuso. 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  $p = 0.010$ ). Nel braccio sperimentale è stato registrato anche un incremento della OS (HR=0.77 95%CI 0.56-1.06  $p = 0.043$ ). Anche questo studio quindi ha confermato l'efficacia di bevacizumab dopo la prima progressione di malattia nel trattamento del mCRC.<sup>158</sup>

Più recentemente è stato introdotto nella pratica clinica Aflibercept, una proteina ricombinante costituita dalle porzioni leganti VEGF dei recettori di VEGF di tipo 1 e di tipo 2, fusa insieme al Fc dell'immunoglobulina umana G1. Aflibercept si lega in modo specifico ai fattori di crescita dell'endotelio vascolare A e B (VEGF-A e VEGF-B) e al fattore di crescita placentare (PlGF). Il legame del composto ai citati fattori di crescita comporta la formazione di un complesso inerte, stabile e privo di attività biologica, e ne impedisce il legame con i recettori endoteliali VEGFR-1 e VEGFR-2 sopprimendo la neovascolarizzazione e diminuendo la permeabilità vascolare. In modelli sperimentali aflibercept mostra una maggiore affinità a VEGF-A rispetto a bevacizumab. Aflibercept è stato approvato in combinazione a FOLFIRI dall'FDA nel 2012 e dall'European Medicines Agency (EMA) nel 2013, per il trattamento dei pazienti con mCRC che sono resistenti o che sono progrediti

a seguito di una terapia contenente oxaliplatino. Ciò è stato possibile a seguito dei risultati dello studio VELOUR che ha randomizzato 1226 pazienti che sono progrediti durante o un successivo completamento di un trattamento di prima linea contenente oxaliplatino con o senza bevacizumab o entro 6 mesi ad una chemioterapia adiuvante a base di oxaliplatino, a ricevere FOLFIRI con aflibercept o placebo, ogni due settimane fino a progressione. L'OS mediana, obiettivo primario dello studio è stata di 13.5 mesi nei pazienti trattati con Aflibercept rispetto ai 12.1 mesi del braccio di controllo (HR=0.81, 95.34%CI 0.71-0.93, p=0.003) così come anche la PFS (6.9 vs 4.7 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). I benefici del trattamento sono stati indipendenti dall'esposizione precedente a bevacizumab. Eventi avversi di grado 3 e 4 sono stati riportati nell'84% dei pazienti trattati con aflibercept rispetto al 63% di quelli che hanno ricevuto solo FOLFIRI. Tra le tossicità di grado 3 e 4, sono state più frequenti nel braccio con aflibercept ipertensione (19.3% vs 1.5 %), proteinuria (7.9% vs 1.2 %), emorragia (2.9% vs 1.7%), in linea con quelle dei farmaci antiangiogenici. Aflibercept inoltre incrementa le tossicità chemio correlate tanto che il tasso diarrea di grado 3 e 4 (12.3% vs 6.9%), mucosite (13,7% vs 5%), neutropenia (5.7% vs 2.8%), infezioni (12.3% vs 6.9 %) e astenia (16.9% vs 10.6%), associate ad aflibercept sono state maggiori rispetto a quelle riscontrate nel braccio con solo FOLFIRI, così come anche la percentuale di pazienti che hanno abbandonato il trattamento per tossicità (27% vs 12 % rispettivamente ).<sup>159</sup>

Ramucirumab è un anticorpo monoclonale ricombinante della classe IgG1 che lega il VEGFR-2, bloccando l'attivazione del recettore. L'efficacia di ramucirumab nel trattamento di seconda linea del mCRC è stata valutata nello studio di fase III in doppio cieco RAISE nel quale 1072 pazienti progrediti ad una prima linea di terapia a base di bevacizumab, oxaliplatino e fluoropirimidine sono stati randomizzati a ricevere FOLFIRI con ramucirumab o placebo fino alla progressione della malattia, tossicità non tollerate o morte. La sopravvivenza mediana è stata significativamente maggiore (13.3 vs 11.7 mesi) nel braccio con ramucirumab (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). Il RR è stato simile nei due bracci. Tossicità maggiori sono state

registrate nel braccio con ramucirumab e includevano neutropenia (38% vs 23%), ipertensione (11% vs 3%), astenia (12 vs 8%). Sulla base di questi risultati, ramucirumab è stato approvato nell'aprile del 2015 dall'FDA in associazione a FOLFIRI nel trattamento dei pazienti progrediti ad una prima linea a base di bevacizumab, oxaliplatino e fluoropirimidine.<sup>160</sup>

Regorafenib è un inibitore orale multichinasico, le cui proprietà antiangiogeniche e antitumorali derivano dall'inibizione di recettori chinasi coinvolti nell'angiogenesi come VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, Tie-2 e di recettori oncogenici tirosinici come c-KIT, RET, RAF-1 e BRAF; regorafenib agisce anche a livello del microambiente tumorale mediante l'inibizione di PDGFR $\beta$  (platelet derived growth factor  $\beta$  receptor) e FGFR (fibroblastic growth factor receptor).<sup>161</sup> L'attività del farmaco nel mCRC refrattario ad altre terapie, è stata dimostrata nello studio CORRECT, nel quale 760 pazienti progrediti a molteplici terapie, sono stati randomizzati a ricevere regorafenib più best supportive care (BSC) o placebo. I pazienti che hanno ricevuto regorafenib hanno avuto un aumento statisticamente significativo dell'OS, end-point primario (6.4 vs 5 mesi, HR=0.77, 95%CI 0.64-0.94).<sup>162</sup> La PFS mediana è stata di 1.9 vs 1.7 mesi (HR=0.49, 95%CI 0.42-0.58,  $p<0.0001$ ) nel gruppo regorafenib vs il gruppo placebo, mentre il controllo della malattia è stato raggiunto nel 41% e nel 15% ( $p<0.0001$ ), rispettivamente. Solo 5 pazienti (1%) trattati con regorafenib hanno potuto beneficiare di una risposta parziale rispetto ad un solo paziente (0.4%) che aveva ricevuto il placebo ( $p=0.19$ ). Il gruppo che ha ricevuto regorafenib ha avuto una maggiore incidenza di reazioni cutanee di grado 3 e 4 (17% vs 0.4%), astenia (10% vs 5%), ipertensione (7% vs 1%), e rash (6% vs 0%). Un' insufficienza epatica fatale si è presentata nell'1.6% dei pazienti trattati con regorafenib vs 0.4% del gruppo che ha ricevuto il placebo. Benefici di regorafenib in monoterapia, sono stati anche confermati nello studio multicentrico CONCUR, nel quale 204 pazienti Asiatici con mCRC che sono progrediti alle terapie standard sono stati randomizzati a ricevere regorafenib o placebo; l'aver ricevuto un farmaco anti-VEGF o anti-EGFR non escludeva i pazienti dallo studio, per cui il 40% dei pazienti in ogni braccio non avevano ricevuto in precedenza una target therapy. Regorafenib ha determinato un aumento dell'OS (8.8 vs 6.3 mesi, HR=0.550, 95%CI 0.39-0.76,  $p=0.0002$ ) e della PFS (3.2 vs 1.7 mesi, HR=0.31, 95%CI 0.22-0.43,  $p<0.00001$ ); come visto



nello studio CORRECT, il controllo della malattia è stato significativamente più alto con regorafenib (51% vs 7%), sebbene soltanto 6 pazienti (4%) abbiano beneficiato di una risposta parziale (nessuno nel gruppo con placebo). Il profilo di tossicità è stato simile a quello osservato nello studio CORRECT. Nell'ottobre del 2012, regorafenib è stato approvato dall'FDA per il trattamento di pazienti con mCRC che siano stati precedentemente trattati con tutti i farmaci chemioterapici disponibili (fluropirimidina, oxaliplatino e irinotecano), un farmaco anti-VEGF e se il paziente risulta *KRAS* wild-type, una terapia a base di farmaci anti-EGFR. E' stato invece approvato dall'EMA nell'agosto del 2013 e da AIFA nell'agosto del 2015.<sup>162</sup>

### **2.3.2 Farmaci anti-EGFR**

Fattori di crescita come l'epidermal growth factor (EGF) e il suo recettore (EGFR) possono essere coinvolti nel controllo autocrino o paracrino della crescita cellulare del CRC, o nello sviluppo dell'angiogenesi e delle metastasi. L'evidenza di un up-regulation dell'EGFR nel 60-80% dei tumori coloretali,<sup>163</sup> ha portato allo sviluppo di farmaci volti ad inibire tale recettore.

Due anticorpi monoclonali (MoAbs) diretti contro l'EGFR si sono dimostrati attivi nel trattamento del mCRC. Cetuximab è un anticorpo monoclonale chimerico murino umano di classe IgG1 che lega il dominio extracellulare dell'EGFR, prevenendo il suo legame con ligandi endogeni come il transforming growth factor -alfa (TGF- $\alpha$ ) e l'EGF; inoltre induce la dimerizzazione del recettore e la sua internalizzazione; è stato approvato dall'FDA per l'utilizzo nel cancro coloretale metastatico nel 2004. Panitumumab, è un anticorpo monoclonale completamente umanizzato che lega la porzione esterna dell'EGFR, analogo a cetuximab sia in termini di meccanismo d'azione che di efficacia; è stato approvato dall'FDA nel 2006 sempre con la stessa indicazione. La tossicità cutanea rappresenta l'evento avverso più frequente di questi farmaci. Eruzioni acneiformi costituite da pustole e papule possono coinvolgere il volto, il cuoio capelluto e la porzione superiore del tronco; sovrainfezioni batteriche secondarie, paronichie, fissurazioni sono possibili. E' stata osservata una correlazione positiva tra l'insorgenza di queste tossicità e l'efficacia del trattamento.<sup>164</sup> Studi di fase II e fase III hanno dimostrato l'utilità dell'impiego di cetuximab insieme ai chemioterapici nel trattamento di prima linea del cancro del colon retto metastatico (mCRC). Van Cutsem et al. hanno condotto uno studio di fase III (CRYSTAL) per valutare l'efficacia di cetuximab

con FOLFIRI come prima linea di trattamento nel cancro del colon retto. Un totale di 1598 pazienti con tumore positivo ad EGFR all'immunoistochimica, sono stati randomizzati a ricevere FOLFIRI da solo o in combinazione con cetuximab (dose iniziale di 400 mg/m<sup>2</sup>, seguita da una dose di 250 mg/m<sup>2</sup> una volta alla settimana). L'endpoint primario dello studio era la PFS: l'aggiunta di cetuximab ha migliorato significativamente la PFS (8.9 mesi vs 8.0 mesi; HR= 0.85, 95% CI 0.72-0.99; p=0.048). Anche in termini di RR, cetuximab più FOLFIRI ha ottenuto un vantaggio significativo rispetto al solo FOLFIRI (RR: 46.9% vs 38.7%; p=0,004) con un aumento delle resezioni chirurgiche radicali ad intento curativo (4.8 % vs 1.7%; p=0,002). Non è stata osservata nessuna differenza significativa in OS, 19.9 mesi vs 18.6 mesi nei gruppi trattati rispettivamente con cetuximab–FOLFIRI e FOLFIRI (HR=0.93, 95% CI 0.81-1.07; p=0.31). Il profilo di tossicità del trattamento di combinazione, cetuximab-FOLFIRI è stato in linea con le attese: l'incidenza di reazioni cutanee di grado 3, in particolare reazioni acneiformi, era significativamente più alta nei pazienti che hanno ricevuto cetuximab rispetto a quelli che hanno ricevuto FOLFIRI da solo (tossicità cutanee: 19.7 % vs 0.2%, p<0.001; rash di tipo acneiforme: 16.2% vs 0.0%, p<0.001). Nessuna delle tossicità riportate erano di grado 4. L'incidenza di diarrea di grado 3 e 4 (15.7% vs 10.5%, p=0,008) e tossicità relative all'infusione (2.5% vs 0.0%, p <0.001) erano significativamente aumentate nel gruppo cetuximab–FOLFIRI.<sup>165,166</sup>

Anche regimi contenenti oxaliplatino sono stati studiati insieme a cetuximab. Lo studio randomizzato di fase II OPUS, ha valutato l'attività di cetuximab in combinazione con FOLFOX4 rispetto a FOLFOX4 da solo in prima linea di trattamento in pazienti con mCRC con espressione di EGFR. Sono stati arruolati 337 pazienti: 169 hanno ricevuto cetuximab (scheda settimanale) più FOLFOX4 e 168 pazienti hanno ricevuto FOLFOX4 da solo. L'aggiunta di cetuximab alla chemioterapia ha dimostrato un aumento, anche se non significativo, in RR (46% vs 36%, p=0.064) e un raddoppio di resezioni R0 (4.7% vs 2.4%). In termini di PFS non è stato ottenuto nessun beneficio con la combinazione cetuximab-FOLFOX4. In generale il trattamento di combinazione è stato ben tollerato e la maggior parte degli eventi avversi riportati di grado 3 e 4 rientravano nel profilo di tossicità conosciuto di cetuximab. Reazioni cutanee (incluse xerosi, eritema, dermatite acneiforme, prurito e desquamazione cutanea) sono state osservate nel 18% dei pazienti trattati con cetuximab più FOLFOX4 rispetto allo 0.6% riferito nel

gruppo trattato con FOLFOX4. Reazioni avverse relative all'infusione si sono manifestate nel 5% e 2% rispettivamente dei pazienti che hanno ricevuto FOLFOX4 con o senza cetuximab. Le reazioni di ipersensibilità e il rash sono state le principali cause di interruzione di cetuximab. L'incidenza di neutropenia di grado 3 e 4 e diarrea di grado 3 era simile nei due gruppi di trattamento (30% e 8%, rispettivamente in cetuximab più FOLFOX4; 34% e 7%, rispettivamente, in FOLFOX4 da solo); non è stata riportata nessuna diarrea di grado 4.<sup>167</sup>

Se è vero che gli anti-EGFR hanno rappresentato una vera e propria rivoluzione nel trattamento dei tumori del colon retto, ne abbiamo conosciuto altrettanto precocemente i limiti. Di fronte all'evidenza che non tutti i pazienti rispondevano a tali farmaci, molti sono stati gli sforzi volti ad identificare possibili fattori predittivi di risposta agli anticorpi anti – EGFR. Dato che l'analisi immunohistochimica dell'espressione di EGFR non si è dimostrata un utile strumento per predire l'efficacia del trattamento, l'attenzione si è spostata verso i mediatori intracellulari, coinvolti nella trasduzione del segnale di EGFR. Le vie di *RAS/BRAF/MAPKs* e di *PTEN/PI3K/AKT* sono state entrambe investigate. Sono state così individuate le mutazioni dei geni della famiglia *RAS* (*KRAS* e *NRAS*), definite attivanti, in quanto rendono la proteina costitutivamente attiva, determinando una stimolazione continua delle tappe molecolari a valle di *RAS*, in particolare della via delle *MAPK* e una spinta proliferativa indipendente dall'attivazione di EGFR. I geni *KRAS* ed *NRAS* si caratterizzano per la possibile presenza di mutazioni attivanti in specifiche regioni geniche ("hot spots") a livello degli esoni 2 (codoni 12 e 13), 3 (codoni 59 e 61) e 4 (codoni 117 e 146). La prevalenza delle mutazioni di *RAS*, tra loro mutuamente esclusive, nel mCRC è stimata attorno al 55% - 60%, con una maggiore frequenza delle mutazioni di *KRAS* rispetto a quelle di *NRAS* (52% e 7% rispettivamente).<sup>168</sup> Risultati di post – hoc analisi su alcuni studi già discussi, hanno dimostrato il ruolo delle mutazioni attivanti di *KRAS* come fattori predittivi di resistenza agli anticorpi anti – EGFR. Ad esempio lo studio CRYSTAL, tenendo conto dello stato mutazionale di *KRAS*, ha dimostrato che soltanto i pazienti con malattia *KRAS* wild-type (codoni 12 e 13), possono beneficiare di cetuximab in combinazione con la chemioterapia sia in termini di PFS (9.9 mesi vs 8.7 mesi, HR=0,68, p=0.017) che di RR (59.3% vs 43.2%, OR= 1.91).<sup>166</sup> Similmente, le post - hoc analisi dello studio OPUS hanno dimostrato che tra i pazienti con malattia *KRAS* wild type, quelli trattati con cetuximab beneficiavano di un miglior outcome

sia in termini di RR che PFS, rispetto ai pazienti che ricevevano solo FOLFOX (RR: 60.7% vs 37.0%,  $p=0.011$ ; PFS: 7.7 mesi vs 7.2 mesi,  $HR=0.57$ ,  $p=0.016$ ).<sup>167,169</sup> Lo studio di fase III PRIME ha randomizzato 1183 pazienti con mCRC non precedentemente trattati, a ricevere panitumumab più FOLFOX4 o solo FOLFOX4. L'end-point primario era la PFS, l'OS il secondario. Originariamente lo studio comprendeva pazienti non selezionati dal punto di vista molecolare, quindi sia wild – type che mutati, ma è stato modificato in corso valutando gli stessi end–points sui pazienti *KRAS* wild-type e quelli mutati. Nei pazienti *KRAS* wild-type, panitumumab - FOLFOX4 ha migliorato significativamente la PFS rispetto al solo FOLFOX4 (9.6 vs 8.0 mesi, rispettivamente;  $HR=0.80$ , 95% CI, 0.66-0.97,  $p= 0.02$ ), mentre non è stata osservata una differenza significativa di OS nei due bracci (23.9 v 19.7mesi,rispettivamente;  $HR=0.83$ , 95% CI, 0.67 to 1.02,  $p = 0.072$ ). Nei pazienti *KRAS* mutati la PFS è risultata significativamente ridotta nel braccio panitumumab – FOLFOX4 rispetto a quello con solo FOLFOX ( $HR= 1.29$ ; 95% CI, 1.04 – 1.62,  $p=0.02$ ), con un OS di 15.5 mesi vs 19.3 mesi rispettivamente ( $HR=1.24$ , 95% CI, 0.98 - 1.57;  $p= 0.068$ ). Lo studio ha dunque dimostrato il beneficio di panitumumab-FOLFOX4 nei pazienti *KRAS* wild-type, sottolineando l'importanza di valutare lo stato mutazionale di *KRAS* nei pazienti con mCRC.<sup>170</sup>

Con la dimostrazione del valore predittivo negativo delle mutazioni nei codoni 12 e 13 di *KRAS*, l'uso degli anticorpi monoclonali si è dunque ristretto a quei pazienti con malattia *KRAS* wild-type. Successivamente sono state descritte altre mutazioni attivanti di *KRAS* oltre a quelle presenti nei codoni 12 e 13. Mutazioni nei codoni 61 e 146 determinano un'attivazione costitutiva della proteina *KRAS* e sono state rilevate con una frequenza tra l'1 e il 4%. In uno studio è stato riportato, che tra 87 pazienti con malattia *KRAS* wild type nei codoni 12 e 13 , nessuno dei pazienti che avevano mutazioni nei codoni 61 o 146 rispondeva a cetuximab più irinotecano. Le mutazioni di *KRAS* nei codoni 61 e 146 erano inoltre associate ad una minore PFS ( $HR:0.46$ ,  $P=0.028$ ), sebbene non ci fossero differenze significative in termini di OS ( $HR: 0.69$ ,  $p=0.390$ ).<sup>168,172 167,171 167,171,168</sup>Douillard et al. hanno pubblicato nel 2013 un'analisi retrospettiva del sopracitato studio PRIME con l'obiettivo di valutare gli effetti di panitumumab + FOLFOX rispetto al braccio con solo FOLFOX in termini di PFS e OS, in 639 pazienti con mCRC, tenendo conto dello stato mutazionale di *KRAS* (esone 3 e 4), di *NRAS* (esone, 2,

3 e 4) e di *BRAF* (esone 15). In 512 pazienti *RAS* wild-type la mPFS è stata di 10.1 mesi e 7.9 nel braccio con FOLFOX + panitumumab e nel braccio con FOLFOX rispettivamente (HR=0.72, 95%CI 0.58-0.90, p=0.04), 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 di sottogruppo di pazienti mutati ha mostrato un effetto detrimentalmente dall'aggiunta dell'anticorpo. Tale studio ha dunque sancito un'ulteriore modifica della label del farmaco, restringendo l'indicazione degli anti-EGFR ai pazienti *RAS* wild-type negli esoni 2, 3 e 4.<sup>173</sup>L'uso nella pratica clinica dei farmaci cetuximab e panitumumab, non può quindi prescindere da un'analisi estesa del gene *RAS*.<sup>174</sup> Sempre in questo studio, è stato confermato il ruolo prognostico negativo della mutazione di *BRAF*, mentre il suo valore predittivo continua a rimanere controverso.

*BRAF* è una serina treonina chinasi ed il principale effettore di *K RAS*. La mutazione V600E di *BRAF* ricorre nel 5-12% dei tumori, e benchè il suo ruolo predittivo non sia stato ancora definitivamente chiarito, diversi studi retrospettivi hanno dimostrato che è associata ad una ridotta risposta a entrambi gli anti EGFR, mentre il suo ruolo prognostico negativo rimane indiscusso.<sup>171</sup>

Alla continua ricerca di fattori predittivi di risposta agli anti-EGFR, si sono affiancati numerosi studi volti all'ottimizzazione dell'utilizzo di cetuximab e panitumumab in prima linea e successive. Diversi studi di fase II hanno dimostrato che la combinazione FOLFOXIRI più anti-EGFR porta a dei benefici in termini di attività e tasso di resezione, al prezzo di un aumento delle tossicità mucosali (principalmente diarrea); nessuno di questi studi aveva arruolato i pazienti sulla base dello stato mutazionale di *RAS* o *BRAF*.<sup>175,176</sup> Tenendo conto di questi dati il GONO ha portato avanti uno studio di fase II in cui si è valutata l'efficacia e la sicurezza di FOLFOXIRI in combinazione a panitumumab in 37 pazienti selezionati da un punto di vista molecolare (*KRAS*, *NRAS*, *HRAS*, *BRAF* wild-type): 33 pazienti hanno beneficiato di una risposta oggettiva (ORR: 89%; 95% CI 75% - 96%), 16 pazienti (43%) sono andati ad una chirurgia secondaria delle metastasi, e resezioni R0 si sono potute ottenere in 13 pazienti. Ad un follow up mediano di 17.7 mesi, la PFS è risultata di 11.3 mesi (95% CI 9.7- 12.2 mesi). Al fine di ridurre il rischio di diarrea sono state ridotte le dosi di irinotecano e fluorouracile.<sup>177</sup>Lo studio multicentrico di fase II MACBETH, ancora in corso, sta valutando la sicurezza e l'attività di una prima linea di terapia a base di

FOLFOXIRI più cetuximab seguita da un mantenimento con cetuximab o bevacizumab, in pazienti con mCRC *RAS* e *BRAF* wild type. Se è vero quindi, che l'uso della tripletta con bevacizumab si sta consolidando sempre più come una reale opzione terapeutica in pazienti ben selezionati, dovremo attendere i risultati di studi in corso e futuri per portare nella normale pratica clinica, l'uso della tripletta con gli anti-EGFR, che per il momento risulta limitato agli studi clinici.

Sempre nell'ambito della prima linea, alcuni studi hanno poi messo a confronto gli anti-EGFR e bevacizumab insieme ai chemioterapici attivi. Lo studio tedesco di fase III FIRE 3 ha dimostrato come il regime di prima linea cetuximab più FOLFIRI offra un vantaggio di 4 mesi di sopravvivenza nei pazienti *KRAS* (esone 2) wild-type con mCRC, rispetto al trattamento bevacizumab più FOLFIRI (28.8 vs 25.0 mo, HR 0.77,  $p=0.0164$ , 95% CI: 0.620-0.953), mentre il RR, che resta l'end-point primario, è risultato comparabile tra i due bracci

(62% vs 57%, odds ratio 1.249). La PFS mediana della popolazione è risultata simile (10.3 vs 10.4 mo, HR= 1.04,  $p=0.69$ ).<sup>178</sup> Il dato sembra essere confermato anche dallo studio PEAK, studio di fase II che ha randomizzato 278 pazienti a ricevere FOLFOX+Bevacizumab o FOLFOX+Panitumumab. Nel sottogruppo di pazienti *KRAS* wild-type la PFS è stata simile nei due bracci (HR=0.87, 95% CI 0.65 to 1.17,  $p=0.353$ ). L'OS mediana è stata di 34.2 mesi nel braccio con panitumumab vs 24.5 mesi nel braccio con cetuximab (HR= 0.62, 95%CI 0.44 to 0.89,  $p=0.009$ ). Nel sottogruppo *RAS* wild-type (esoni 2, 3, e 4 di *KRAS* and *NRAS*), la PFS è stata a favore del braccio con panitumumab (HR=0.65, 95% CI 0.44-0.96,  $p=0.029$ ) mentre l'OS mediana è risultata di 41.3 and 28.9 mesi (HR=0.63, 95%CI, 0.39-1.02,  $p=0.058$ ) nel braccio con panitumumab e bevacizumab rispettivamente.<sup>179</sup> Questi dati non sono stati confermati dallo studio di fase III CALGB 80405 che ha arruolato 1140 pazienti *KRAS* wild-type con mCRC, a ricevere una prima linea con FOLFIRI o FOLFOXIRI con cetuximab o bevacizumab. Lo studio non ha dimostrato un vantaggio in termini di OS, end-point primario, e PFS nel braccio contenente cetuximab rispetto a quello con bevacizumab. La PFS è risultata di 11 mesi in entrambi i bracci (HR=1.1,  $p=0.31$ ), mentre l'OS mediana di 31 mesi (HR=0.9,  $p=0.40$ ). I dati analizzati sulla base delle altre mutazioni di *RAS* sono stati presentati all'ESMO 2014 su una piccola percentuale di pazienti e non hanno dimostrato alcun vantaggio a favore di cetuximab. Al momento attuale quindi non è possibile dire quale sia il farmaco

biologico migliore da associare ad una chemioterapia di I linea: bevacizumab e cetuximab/panitumumab restano entrambi una valida opzione nei pazienti *RAS* wild-type.<sup>180</sup> Tre studi diversi (BOND-2, PACCE e CAIRO2) hanno valutato una terapia concomitante con bevacizumab e inibitori di EGFR, dimostrando un'assenza di efficacia se non addirittura un effetto detrimentalmente. Le ragioni della mancanza di questa sinergia sono sconosciute; qualche dato sembra suggerire che il trattamento con bevacizumab riduca l'attività degli anticorpi anti-EGFR, limitando la distribuzione del farmaco alle cellule tumorali.<sup>181</sup>

Diversi studi hanno poi valutato l'eventuale utilizzo di farmaci anti-EGFR in seconda linea. Lo studio multicentrico di fase III EPIC, ha randomizzato 1298 pazienti con mCRC progrediti ad una prima linea a base di 5FU e oxaliplatino, a ricevere cetuximab più irinotecano o irinotecano da solo. L'OS (endpoint primario dello studio) era sovrapponibile nei due bracci: 10.7 mesi (95% CI, 9.1-11.3) con cetuximab/irinotecano e 10 mesi (95% CI, 9.1-11.3) con irinotecano da solo (HR=0.975, 95%CI 0.854-1.114, p=0.71). La combinazione con il biologico ha migliorato significativamente la PFS (4.0 vs 2.6, HR= 0.692, 95%CI, 0.617-0.776, p=0.71), il RR ( 16.4% vs 4.2% p<0.0001) e gli scores della quality of life (QOL) analisi. Cetuximab non ha aumentato le tossicità, eccetto che per il rash acneiforme, diarrea, ipomagnesemia e alterazioni elettrolitiche. La neutropenia si è presentata come la più frequente tossicità in entrambi i bracci di trattamento. Tuttavia in questo studio i pazienti non sono stati selezionati in base alle mutazioni di *RAS*, ma solo in base alle caratteristiche immunoistochimiche, cosa che ha influito sui risultati.<sup>182</sup> Un altro studio ha randomizzato 1186 pazienti precedentemente trattati con fluoropirimidine, a ricevere FOLFIRI con o senza panitumumab. Gli endpoints primari dello studio erano l'OS e la PFS. Sebbene in un primo momento l'analisi prospettica in base allo stato mutazionale di *KRAS* non aveva dimostrato benefici statisticamente significativi nel braccio contenente panitumumab,<sup>183</sup> un'analisi retrospettiva recente che ha tenuto conto di una valutazione estesa dello stato mutazionale di *RAS* (*KRAS* esoni 3 e 4, *NRAS* esoni 2, 3, 4; *BRAF* esone 15), ha dimostrato un vantaggio significativo nel braccio con panitumumab rispetto a quello con solo FOLFIRI sia in termini di PFS ( 6.4 vs 4.6 mesi, HR=0.70, 95%CI 0.54 – 0.91, p=0.007) che di OS (16.2 vs 13.9 mesi, HR= 0.81, 95%CI 0.63 – 1.03, p=0.08).<sup>184</sup> Anche lo studio inglese PICCOLO, ha dato risultati sovrapponibili al precedente: 460 pazienti *KRAS* wild-type,

precedentemente trattati con una fluoropirimidina, sono stati randomizzati a ricevere panitumumab più irinotecano o solo irinotecano. Non si è osservata nessuna differenza in termini di OS (endpoint primario) nei due bracci (HR=1.01, 95%CI 0.83-1.23, p=0.919), mentre i pazienti del gruppo panitumumab-irinotecano hanno avuto un beneficio sia in termini di PFS (HR=0.78, 95% CI, p=0.015) che RR (34% vs 12% p<0.0001) rispetto ai pazienti che avevano ricevuto solo irinotecano. Di questo studio non sono ancora disponibili i dati relativi alle analisi dei pazienti *RAS* wild-type.<sup>185</sup> Gli studi appena visti dimostrano dunque che il beneficio degli anti-EGFR in seconda linea è possibile solo con un' accurata selezione dei pazienti wild-type sulla base dell'analisi molecolare estesa di *RAS*.

Recentemente Ciardiello et al. hanno presentato i risultati dello studio di fase II CAPRI-GOIM che ha arruolato 153 pazienti con carcinoma coloretale metastatico senza mutazioni nell'esone 2 del gene *KRAS*. Tutti i partecipanti sono stati trattati con la chemioterapia di prima linea FOLFIRI più cetuximab fino alla progressione della malattia o alla comparsa di tossicità inaccettabili. Dopo la prima linea di trattamento, i pazienti che avevano presentato una progressione della malattia sono stati randomizzati 1:1 a ricevere una seconda linea di trattamento con FOLFOX più cetuximab o il solo regime FOLFOX. L'endpoint primario dello studio era la PFS, gli endpoint secondari l'OS, il RR e la sicurezza. I risultati dell'analisi intention-to-treat, hanno mostrato un vantaggio nella PFS in favore di FOLFOX più cetuximab come seconda linea di trattamento. La differenza non era però statisticamente significativa rispetto al gruppo di controllo. La PFS media era di 6,4 mesi con FOLFOX più cetuximab e di 4,5 mesi con solo FOLFOX (HR= 0,81, IC 95% 0,58, 1,12 log-rank test, p = 0,19). Per capire il motivo dei risultati, sono state condotte delle analisi di next generation sequencing (NGS) dei geni interessati utilizzando i campioni dei tumori primari dei pazienti. In particolare, sono stati analizzati 500 hotspots mutazionali in 22 geni. Le analisi NGS sono state possibili per 117 pazienti e hanno rilevato che 66 soggetti non presentavano mutazioni in *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* e *PIK3CA* e 51 soggetti presentavano una mutazione in almeno uno di questi quattro geni. La mutazione dell'esone 2 del gene *KRAS* è stata identificata nel 15% dei tumori originariamente identificati come wild-type. Nei pazienti wild-type per i quattro geni analizzati, l'effetto dell'aggiunta di cetuximab in seconda linea è stata rilevante con una PFS mediana di 6.9 mesi nel braccio con cetuximab e di 5.3 mesi nel braccio con solo FOLFOX (HR = 0.56;



95% CI 0.33–0.94,  $p = 0.025$ . Al contrario, nei pazienti con almeno una mutazione in uno dei quattro geni, la PFS mediana è risultata di 2.7 mesi nel braccio cetuximab più FOLFOX e 4.4 mesi per il braccio con solo FOLFOX (HR = 1.70, 95% CI 0.94–3.05,  $p = 0.07$ ). Si tratta dunque del primo studio che ha dimostrato che nei pazienti con mCRC, privi di mutazioni nei geni *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* e *PIK3CA*, la terapia con FOLFOX più cetuximab migliora la PFS rispetto a FOLFOX da solo, dopo una progressione ad una terapia a base di cetuximab FOLFIRI. Al contrario un effetto detrimentalmente della combinazione di cetuximab FOLFOX è stato osservato nei pazienti che presentano mutazioni in uno dei quattro geni *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* o *PIK3C*.<sup>186</sup>

#### **2.4 Trattamento di prima linea della malattia metastatica**

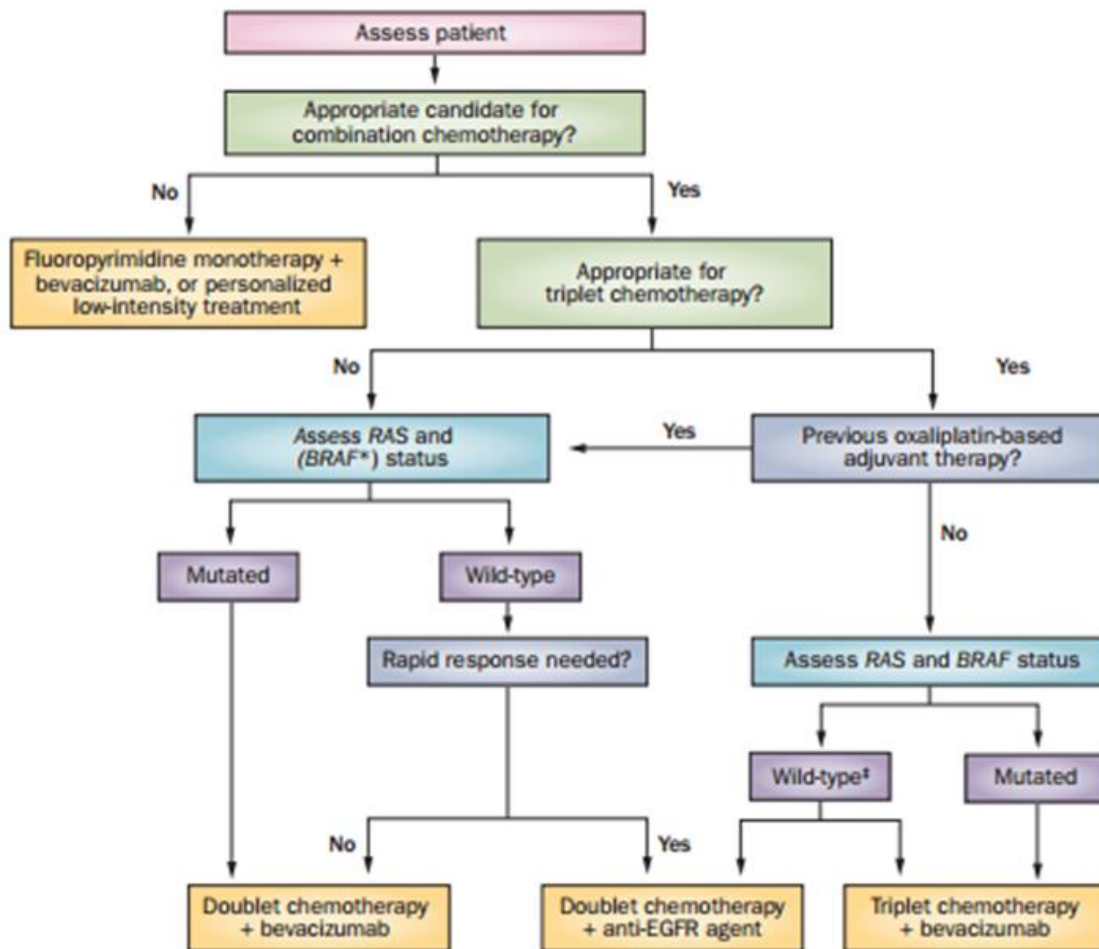
Stabilire una prima linea di trattamento adeguata è un fattore determinante nell'outcome dei pazienti con mCRC, per tre ragioni fondamentali:

1. Una terapia effettuata precocemente può rappresentare un'opportunità unica di cura in alcuni pazienti;
2. può ritardare la progressione di malattia e migliorare i sintomi;
3. può favorire l'utilizzo di ulteriori trattamenti in quei pazienti che hanno beneficiato di una prima linea efficace.

Nell'ultima decade, la scelta di una terapia di prima linea è stata ulteriormente complicata dalla disponibilità di nuovi agenti farmacologici, senza un consenso definitivo riguardo allo standard di cura più adeguato da seguire. Come mostrato nei paragrafi precedenti, molti degli sforzi della comunità scientifica sono stati volti a stabilire quale fosse l'agente biologico più idoneo da combinare con una doppietta chemioterapica, sebbene un filone di ricerca diverso ma parallelo, abbia fornito nuovi dati che sottolineino l'importanza della scelta della chemioterapia di prima linea come spina dorsale del trattamento.

Tenendo conto di tali considerazioni, Cremolini et al. hanno recentemente pubblicato una review evidence-based, che non vuole tanto imporre uno standard terapeutico definitivo, bensì fornire un utile strumento in grado di

guidare il medico oncologo nel trattamento di prima linea dei pazienti con mCRC, in quella che è la pratica clinica di tutti i giorni.



Seguendo l'algoritmo terapeutico sopra rappresentato, i pazienti con una malattia non resecabile devono per prima cosa essere sottoposti ad una valutazione clinica per determinare la loro eleggibilità o meno, ad una chemioterapia di combinazione (doppiette FOLFOX, FOLFIRI, XELOX o la tripletta FOLFOXIRI), tenendo conto della loro età, ECOG performance status, comorbidità, motivazione personale e aspettative. Pazienti unfit, che non possono sostenere i suddetti regimi, possono essere trattati con una monochemioterapia a base di fluoropirimidina e bevacizumab o con un trattamento personalizzato a bassa intensità di dose. Pazienti invece eleggibili per la doppietta, ma non una tripletta chemioterapica possono beneficiare di bevacizumab o di un anticorpo monoclonale anti-EGFR (cetuximab o panitumumab), in base allo stato mutazionale di *RAS* e di *BRAF*.

I pazienti *BRAF* mutati, meritano una specifica considerazione a causa della loro prognosi infausta. Sulla base delle prove disponibili, è indubbio che FOLFOXIRI più bevacizumab rappresenti attualmente l'approccio migliore in termini di sopravvivenza (OS mediana di circa 20 mesi); la tripletta permette inoltre un più efficace controllo della malattia consentendo ulteriori linee di trattamento future. Qualora l'impiego della tripletta non sia perseguibile, la doppietta insieme a bevacizumab è un'opzione da preferire in questo tipo di pazienti; inoltre l'attività di bevacizumab non risulta inficiata dallo stato mutazionale di *BRAF*. Considerando i risultati del sopracitato studio TRIBE, pazienti che invece sono candidabili alla tripletta, (età < 75 anni, tra 70 e 75 anni con ECOG performance status > di 0, pazienti non precedentemente esposti ad oxaliplatino) possono essere trattati con FOLFOXIRI più bevacizumab, indipendentemente dal loro stato mutazionale;<sup>123</sup> in ogni caso pazienti *RAS* e *BRAF* wild-type possono beneficiare di una doppietta chemioterapica più farmaci anti-EGFR. Al momento non ci sono ancora dati che confrontino quale dei due trattamenti sia migliore nei pazienti wild-type, per cui la scelta terapeutica dovrebbe tenere di conto dei differenti profili di tossicità di questi regimi.

## **2.5 Seconda linea e successive**

Come strategia terapeutica i pazienti che vanno in progressione dopo una prima linea, dovrebbero essere sottoposti ad un trattamento di seconda linea tutte le volte che le condizioni lo consentono. La scelta di un trattamento di seconda linea dovrebbe tenere in considerazione i punti seguenti:

- condizioni cliniche del paziente (fit/unfit, eventuali comorbidità)
- tipo di farmaci impiegati in prima linea
- benefici e tossicità osservati nei trattamenti precedenti
- stato mutazionale del paziente
- aspettative di vita

La dimostrazione che la sopravvivenza è correlata al numero dei chemioterapici attivi (fluoropirimidina, oxaliplatino e irinotecano) impiegati nel corso della storia di malattia, giustifica l'impiego della chemioterapia nella seconda linea di trattamento.<sup>187</sup> Diversi farmaci a bersaglio molecolare sono disponibili in questo

setting: bevacizumab può essere impiegato beyond progression o direttamente in seconda linea con un regime a base di fluoropirimidine; aflibercept in associazione a FOLFIRI in pazienti che abbiano ricevuto una prima linea con oxaliplatino; ramucirumab (non ancora approvato da AIFA) sarà disponibile in futuro in pazienti progrediti ad una prima linea a base di oxaliplatino e bevacizumab; gli anti EGFR possono essere impiegati in associazione alla chemioterapia in pazienti che non li abbiano ricevuti in prima linea.

Dopo l'esposizione a tutti gli agenti chemioterapici attivi, un numero significativo di pazienti è ancora in grado di ricevere linee successive di trattamento. Diversi studi hanno dimostrato il beneficio di cetuximab con o senza irinotecano in termini sia di OS che di PFS, in pazienti *RAS* wild-type che hanno già ricevuto regimi chemioterapici a base di irinotecano e oxaliplatino, per cui l'uso di cetuximab in monoterapia o in combinazione con irinotecano in pazienti che non hanno mai ricevuto nel corso della loro malattia farmaci anti-EGFR, può trovare indicazione in questo setting di pazienti. Nello stesso setting, un'alternativa a cetuximab in monoterapia o in caso di reazione allergica a cetuximab stesso, panitumumab può essere impiegato in monoterapia.<sup>188,189</sup> Negli ultimi anni l'armamentario terapeutico di terza linea e successive, si è ampliato grazie all'introduzione di nuovi agenti farmacologici. Nei pazienti sottoposti a più linee di terapia comprendenti tutti i farmaci citotossici (fluoropirimidina, oxaliplatino e irinotecano) e biologici attivi (anti-VEGF e anti-EGFR se indicati), due sono le opzioni terapeutiche che hanno dimostrato un vantaggio in OS rispetto a placebo: *regorafenib*, un inibitore multichinasico che ha come bersaglio l'angiogenesi, le cellule tumorali e lo stroma<sup>162</sup>; TAS-102 (non ancora approvato da AIFA, ad oggi disponibile in Italia come uso compassionevole) un analogo delle fluoropirimidine<sup>143</sup>.

## Capitolo 3. STUDIO CRICKET

**STUDIO DI FASE II, A SINGOLO BRACCIO, DI TERAPIA DI III LINEA CON RECHALLENGE DI CETUXIMAB ED IRINOTECANO IN PAZIENTI CON CARCINOMA COLORETTALE METASTATICO *KRAS*, *NRAS* E *BRAF* WILD-TYPE E IRINOTECANO-PRETRATTATI PROGREDITI, DOPO AVER OTTENUTO UN'INIZIALE RISPOSTA, AD UNA TERAPIA DI PRIMA LINEA CONTENENTE CETUXIMAB**

### 3.1 Acronimo

**Cetuximab Rechallenge in Irinotecan-pretreated mCRC, *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* wild-type treated in 1st line with anti-EGFR Therapy (CRICKET)**

### 3.2 Introduzione e razionale dello studio

#### 3.2.1 Pathway EGFR e meccanismi di resistenza

La maggior parte dei tumori coloretali (60-80%) è caratterizzata dall'attivazione funzionale di fattori di crescita e recettori della famiglia dell'EGFR. L'EGF e TGF- $\alpha$  sono i principali ligandi di questo recettore. L'EGFR è strutturato in tre diversi domini: il primo idrofilo extracellulare, che rappresenta il sito di legame con il ligando, il secondo, idrofobico transmembranario, ed il terzo, intracellulare, che possiede un'attività tirosina chinasi (TK) utile per la trasmissione del segnale a valle. L'interazione del ligando con il dominio extracellulare provoca una dimerizzazione del recettore monomero con un'altra molecola di EGFR e induce l'attivazione del dominio intrinseco del recettore e conseguente fosforilazione dei residui di tirosina specifici nella coda citoplasmatica. I residui fosforilati fungono da siti di ancoraggio per una serie di molecole a valle e, in ultima analisi, la regolazione della trascrizione genica.

Una delle vie molecolari fondamentali attivate dall'EGFR è quella reclutata attraverso il legame con la proteina SOS che, legandosi ai residui fosforilati, è traslocata sul lato interno della membrana plasmatica e facilita l'attivazione delle proteine della famiglia *RAS* (*KRAS* e *NRAS*); in seguito alla sua attivazione, *RAS* diventa più affine per il GTP perdendo viceversa la capacità di legare il GDP. Questa modificazione è tuttavia rapidamente reversibile in quanto *RAS*, legandosi con la proteina GAP, diviene in grado di idrolizzare il GTP in GDP, perdendo nuovamente la sua attività. Per questo l'attività di *RAS* viene detta pulsatoria. *RAS* determina l'attivazione della serina/treonina chinasi *RAF*, della *MAPKK* 1 e 2, e delle *MAPK ERK* 1 e 2.

Il risultato dell'attivazione di questa via molecolare è l'espressione di varie proteine nucleari, inclusa la ciclina D1 (necessaria per il passaggio G1-S nel ciclo cellulare e quindi per la proliferazione cellulare).

Un'altra via di trasduzione attraverso EGFR è il pathway *PI3K*. Il reclutamento di *PI3K* porta all'attivazione di *AKT*, una serina treonina chinasi con attività antiapoptotica. Altro pathway a valle dell'EGFR vede l'attivazione di *STAT*, in particolare *STAT3*, fattore di trascrizione (TF) che, una volta attivato, dimerizza e trasloca all'interno del nucleo, dove modula la trascrizione genica. Quindi una deregolazione dell'EGFR può incidere sul processo di tumorigenesi tramite la stimolazione della proliferazione cellulare, l'inibizione dell'apoptosi ma anche attraverso l'induzione di processi angiogenetici e la disregolazione dell'interazione cellula-cellula. Inoltre promuove l'invasività attraverso l'up-regulation o l'attivazione di metalloproteasi della matrice e stimola la motilità delle cellule tumorali che contribuiscono alla formazione delle metastasi.<sup>42</sup>

Cetuximab (anticorpo monoclonale chimerico umano) e panitumumab (anticorpo monoclonale completamente umanizzato) agiscono legandosi sul versante extracitoplasmatico di EGFR determinandone quindi l'inibizione del recettore sia da un punto di vista puramente chimico, sia determinando un ingombro sterico che impedisce l'attacco del fattore solubile EGF al recettore stesso. Dati provenienti dalla letteratura recente hanno chiaramente sottolineato come le mutazioni attivanti di *RAS* (*KRAS* e *NRAS*) rappresentino un fattore predittivo di risposta negativo alla terapia con cetuximab o panitumumab. I geni *KRAS* ed *NRAS* si caratterizzano per la possibile presenza di mutazioni attivanti in specifiche regioni geniche ("hot spots") a livello degli esoni 2 (codoni 12 e 13), 3 (codoni 59 e 61) e 4 (codoni 117 e 146).<sup>190,191</sup>

La prevalenza delle mutazioni di *RAS*, tra loro mutuamente esclusive,<sup>192</sup> nel mCRC è stimata attorno al 55% - 60%, con una maggiore frequenza delle mutazioni di *KRAS* rispetto a quelle di *NRAS* (52% e 7% rispettivamente). Le mutazioni di *HRAS*, terzo membro della famiglia di *RAS*, ricorrono con poca frequenza nei tumori coloretali.<sup>193</sup>

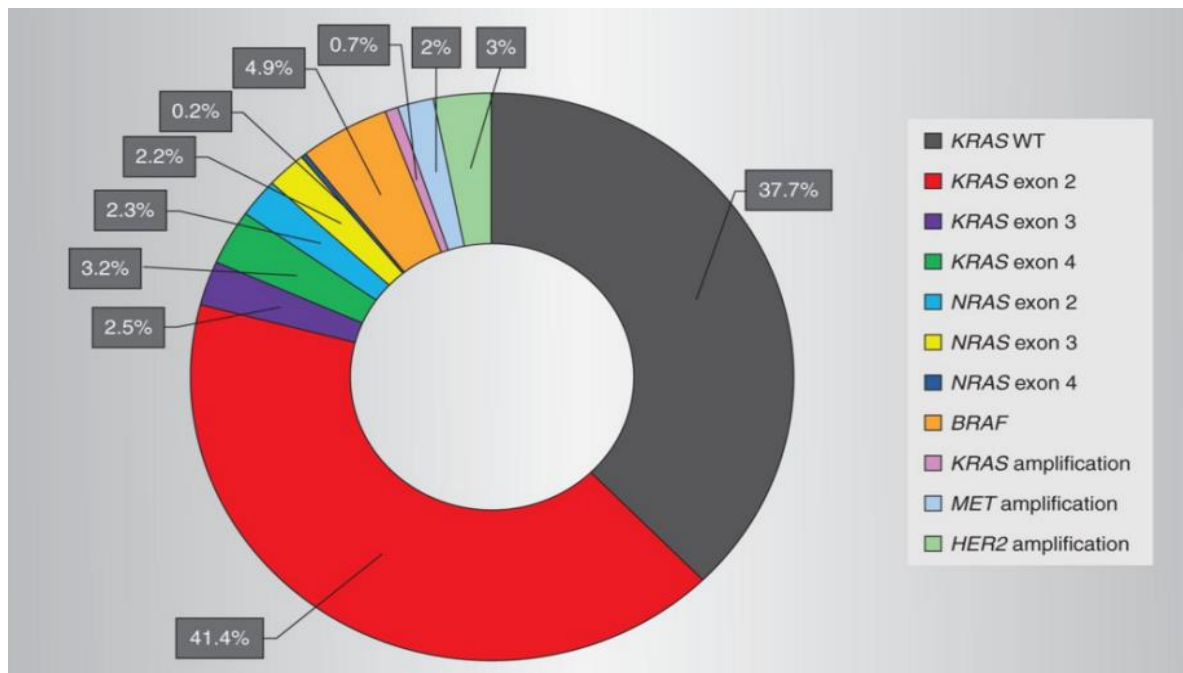
Diversi studi clinici hanno dimostrato che pazienti portatori della mutazione *V600E* di *BRAF* hanno una prognosi peggiore<sup>194,195</sup> e limitate possibilità di beneficiare di una terapia a base di anti-EGFR;<sup>171,172,196</sup> le mutazioni di *BRAF* sono mutuamente esclusive con le mutazioni di *RAS*. Complessivamente le mutazioni di

*RAS* e *BRAF* vengono ritrovate in più del 60% dei pazienti con mCRC. Altri meccanismi di resistenza sono stati recentemente investigati. Si è scoperto che l'amplificazione del gene *KRAS*, trovata nell'1-2% dei mCRC e quasi sempre mutualmente esclusiva con la mutazione attivante di *KRAS*, si associa ad una mancata risposta agli anti-EGFR.<sup>197,198</sup>

Meccanismi genetici aggiuntivi possono inoltre attivare il pathway EGFR-*RAS* in assenza di alterazioni molecolari che coinvolgono *RAS* o i suoi mediatori immediatamente a valle. Amplificazioni dei geni *MET* o *ERBB2* hanno dimostrato bypassare il segnale di EGFR e attivare la cascata di *MEK-ERK*; amplificazioni di *MET* e *ERBB2* sono state effettivamente ritrovate in pazienti *RAS* wild-type che non rispondevano a cetuximab.<sup>199,200</sup>

Anche la via *PI3K-AKT-PTEN* viene attivata da EGFR e diversi studi sono stati condotti per definire se alterazioni molecolari a questo livello, potessero conferire resistenza a cetuximab o panitumumab. Risultati di laboratorio hanno dimostrato che mutazioni dell'esone 20 di *PIK3CA* sono associate ad una non responsività agli anti-EGFR, sebbene tale correlazione traslata nella pratica clinica non sembri così forte, probabilmente per le piccole dimensioni degli studi effettuati e per l'effetto confondente della chemioterapia concomitante.<sup>201</sup> Per quanto riguarda le mutazioni di *PTEN*, anche queste mostrano una mancanza di risposta ai farmaci, ma i dati non sono ancora definitivi.<sup>202</sup>

La mutazione puntiforme S492R del dominio extracellulare di EGFR, più che costituire un meccanismo di resistenza intrinseca, può insorgere in corso di trattamento con cetuximab secondo un meccanismo di resistenza acquisita, mentre non sembra interferire con il legame di panitumumab.<sup>203</sup> Il grafico sottostante riassume alcune delle alterazioni genetiche coinvolte nella resistenza primaria alla terapia. La popolazione *KRAS* wild-type (WT) rappresenta la somma dei responder alla terapia anti-EGFR (circa il 10%) e quella frazione di pazienti che non hanno beneficiato di quei trattamenti anche in assenza di mutazioni primarie conosciute. Mutazioni nell'esone 3 e 4 di *KRAS*, nell'esone 2,3,4 di *NRAS*, così come l'amplificazione di *KRAS*, *HER2* e *MET* costituiscono il 20 % dei pazienti che non beneficiano dal trattamento degli anti-EGFR.<sup>204</sup>

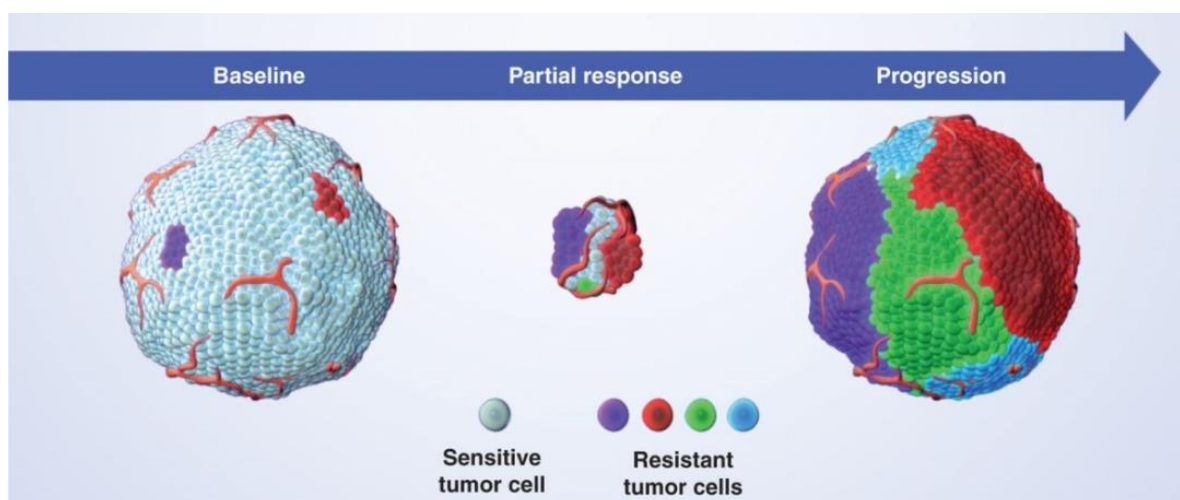


### 3.2.2 Eterogeneità tumorale

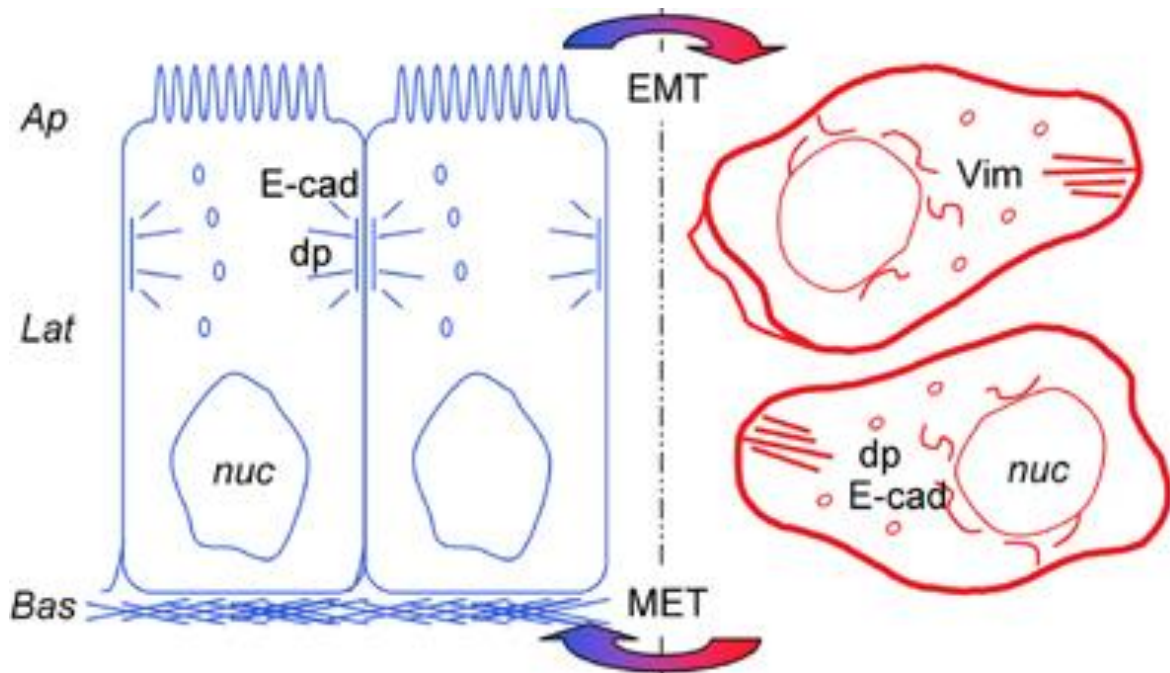
Nel 1976 Peter Nowell affermò che “la progressione tumorale deriva dalla variabilità genetica acquisita all’interno del clone originale che permette la selezione sequenziale di cloni più aggressivi”; capì inoltre l’importanza di svolgere ricerche che andassero in tale direzione, al fine di comprendere meglio la biologia tumorale e perfezionare nuovi trattamenti. Da allora molti progressi sono stati fatti e negli anni si è fatta strada l’ipotesi, sostenuta da numerose evidenze, che ogni tumore possa essere effettivamente visto come un microcosmo eterogeneo in continua evoluzione, dinamico dal punto di vista molecolare, pronto a modificarsi in seguito alle modificazioni dell’ambiente. Non diversamente dalla teoria Darwiniana della selezione naturale della specie, i farmaci chemioterapici e biologici favorirebbero la selezione di subcloni cellulari presenti nel tumore, portanti alterazioni genetiche che favoriscono la resistenza agli stessi e la successiva progressione tumorale. Uno studio recente ha dimostrato come il profilo genetico del tumore primario e delle metastasi non sia sempre concordante a causa dell’eterogeneità del tumore, senza contare che gli agenti chemioterapici così come le terapie target possono alterare l’assetto molecolare del tumore. Tecnologie di biologia molecolare come la next - generation sequencing (NGS), in grado di studiare l’intero genoma tumorale, hanno permesso di esaminare l’eterogeneità molecolare in campioni tissutali tumorali, inclusi quelli di origine



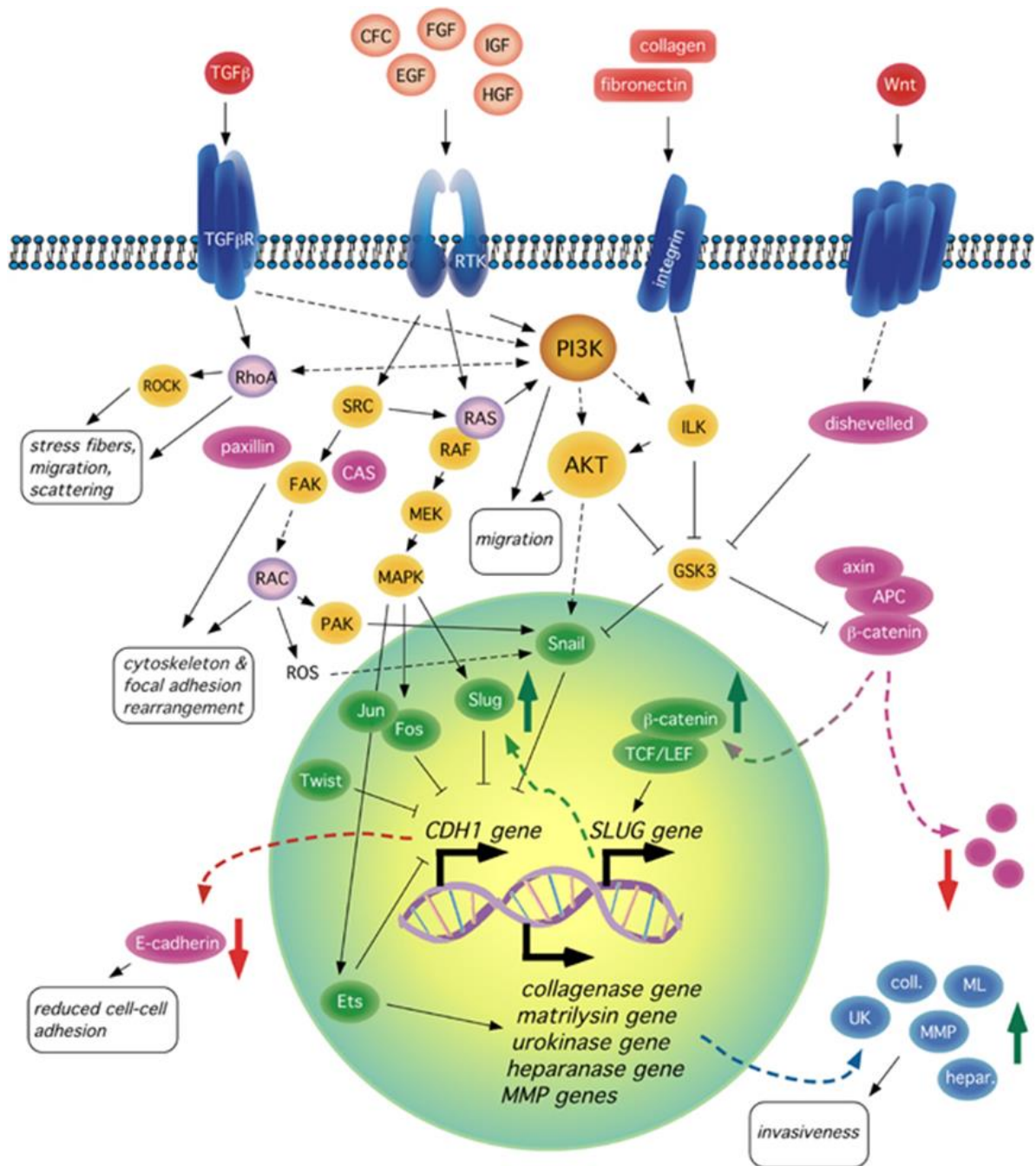
colorettale.<sup>205</sup> Diversi studi hanno sottolineato l'importanza dell'eterogeneità tumorale nell'ambito di pazienti con mCRC *RAS* wild-type sottoposti a terapia con anti-EGFR, fornendo un razionale di una possibile terapia di rechallenge in questo setting di pazienti. In uno studio Gattenlohner et al. hanno valutato lo stato mutazionale di *KRAS/BRAF* prima e dopo il trattamento con anticorpi anti-EGFR, con il risultato di una concordanza del 95% per *KRAS* e del 100% per *BRAF*. Tuttavia, dal 5% al 10% dei mCRC presentavano un'eterogeneità molecolare di *KRAS* all'interno del tumore primitivo, linfonodi e metastasi a distanza.<sup>206</sup> Baldus et al. hanno invece valutato lo stato mutazionale dei geni *KRAS*, *BRAF*, e *PI3K* nel tumore primitivo, confrontando la porzione centrale del tumore con il fronte di invasione tumorale. L'eterogeneità intratumorale dello stato mutazionale di *KRAS*, *BRAF*, e *PIK3CA* è stata osservata rispettivamente nell' 8%, 1%, e 5% del tumore primitivo.<sup>207</sup> Tenendo conto di queste evidenze, la progressione della malattia dopo un'iniziale risposta ad un farmaco anti-EGFR in un tumore primitivo *KRAS* wild-type, potrebbe non essere dovuta tanto ad un'acquisizione tardiva di una mutazione, quanto più alla progressiva prevalenza di un clone mutato, per mezzo di una selezione cetuximab indotta verificatasi durante la terapia. Il ricorso a terapie a base di cetuximab in pazienti con mCRC *KRAS* wild - type, anche senza modificare lo stato dei geni *KRAS*, potrebbe portare alla distruzione delle cellule wild-type e alla prevalenza di cloni mutati già presenti, guidando, dopo un'iniziale riduzione del tumore, ad una resistenza acquisita e alla prima progressione della malattia. A questo punto, una terapia di salvataggio a base di cetuximab potrebbe riuscire in un ulteriore shrinkage della malattia.



Dati di laboratorio sembrano confermare queste evidenze cliniche. L'entrata delle cellule tumorali in una transizione da epiteliali a mesenchimali (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) o viceversa in una transizione da mesenchimali ad epiteliali potrebbe spiegare rispettivamente la risposta o la refrattarietà al trattamento, nei pazienti ritrattati con cetuximab. L'EMT è caratterizzata dalla perdita combinata delle proteine giunzionali delle cellule epiteliali come le E-caderine e dal guadagno di marcatori mesenchimali come la vimentina.



E' probabile che le cellule epiteliali siano molto più suscettibili alle terapie anti-EGFR a causa della loro attivazione della via di segnalazione intracellulare *AKT* attraverso *EGFR-ErbB3*. D'altra parte le cellule mesenchimali attivano *AKT* attraverso vie alternative come le integrine associate alle chinasi (integrine linked kinase, *ILK*) e sono in gran parte resistenti agli inibitori di EGFR. Una terapia a base di cetuximab potrebbe condurre nel corso del trattamento, dopo una prima risposta, all'attivazione di questa via alternativa, *ILK* dipendente, la quale favorirebbe l'EMT.<sup>208</sup> Un' ulteriore linea di trattamento priva di anti-EGFR potrebbe down regolare questo processo ripristinando la sensibilità a cetuximab.



Schematizzazione del pathway di trasduzione del segnale associato alla transizione epiteliale – mesenchimale. RTK: receptor tyrosine kinase; ROS: reactive oxygen species.

Tenendo conto di questa eterogeneità e dinamicità tumorale, potrebbe risultare utile monitorare periodicamente nel corso della terapia, il profilo genetico tumorale dei pazienti con mCRC *RAS* wild-type. Il ricorso a biopsie tissutali ripetute nel tempo viene tuttavia sconsigliato. Esistono effettivamente alcune difficoltà nella raccolta di una biopsia tissutale, in primis un notevole impegno e discomfort per il paziente, nonché potenziali complicazioni chirurgiche e costi importanti di

gestione. Non è detto poi che il tumore sia sempre accessibile ad una biopsia, la procedura stessa potrebbe aumentare il rischio di insembramento del tumore in altre sedi<sup>209</sup> e non essere raccomandabile in pazienti che fanno farmaci antiangiogenetici.<sup>210</sup> Ammesso anche che più sedi metastatiche possano essere biopsiate, l'analisi di diversi campioni può ritardare l'inizio del trattamento mettendolo a repentaglio. Al fine di superare le limitazioni legate alla biopsia tissutale è stata proposta l'analisi del DNA tumorale libero circolante (Circulating cell-free tumor DNA analysis, cftDNA) per mezzo di una procedura chiamata biopsia liquida, la quale potrebbe essere impiegata per monitorizzare sia la resistenza primaria dovuta alla eterogeneità del tumore, sia quella secondaria dovuta alla selezione di cloni resistenti in corso della terapia. Sembra che esistano almeno due meccanismi, non mutualmente esclusivi per mezzo dei quali le cellule tumorali rilasciano il DNA all'interno del circolo ematico: uno passivo, in cui le cellule che vanno incontro a necrosi o apoptosi liberano DNA nucleare e mitocondriale a seguito della distruzione cellulare;<sup>211</sup> uno attivo in cui le cellule tumorali secernono direttamente i frammenti di DNA in circolo.<sup>212</sup> Anche le cellule tumorali circolanti (circulating tumour cells, CTCs) potrebbero rilasciare cftDNA, per quanto i dati non siano ancora del tutto conclusivi.<sup>213</sup> Il monitoraggio di alterazioni geniche tumore associate può essere usato per valutare la presenza di malattia residua, recidiva e resistenza del tumore, al fine di intraprendere un trattamento o di modificarlo se questo già presente. Alcuni studi dimostrano inoltre che l'analisi del DNA circolante può essere usata per individuare precocemente l'insorgenza di mutazioni di *RAS* durante il trattamento con cetuximab o panitumumab in pazienti wild-type, 5-10 mesi prima che la progressione tumorale sia clinicamente manifesta.<sup>214,215</sup> Sulla base di questi dati promettenti, Siravegna et al. hanno recentemente pubblicato uno studio in cui è stato utilizzata l'analisi del DNA tumorale libero circolante, per tracciare il profilo genetico di 100 tumori coloretali metastatici e monitorizzare l'evoluzione clonale di 16 tumori *RAS* wild-type durante la terapia con anti-EGFR. In 97 casi su 100 (97%) si è registrata una concordanza dello stato mutazionale di *RAS* tra il campione plasmatico e quello tissutale. Due dei casi discordanti derivavano da soggetti con basso carico tumorale (malattia limitata ai linfonodi o lesioni < 1.5 cm). In 8 casi, sono state invece individuate mutazioni che non erano state rilevate nell'analisi tissutale, provando come la biopsia liquida sia maggiormente in grado

di descrivere l'eterogeneità intratumorale. L'analisi ha inoltre dimostrato che nel corso della terapia, si ha un incremento della percentuale di alleli *KRAS* mutati responsabili della resistenza alla terapia e della progressione della malattia. Sorprendentemente alla sospensione del farmaco anti-EGFR si è osservato un declino degli alleli *KRAS* mutati, sia per quanto riguarda la frequenza delle mutazioni che il numero di copie. Da questa evidenza si può dedurre che i tumori colorettali trattati con anti-EGFR mantengono una notevole plasticità, conseguenza di una continua e dinamica evoluzione clonale delle cellule tumorali in corso di trattamento e non. Lo studio fornisce dunque un razionale molecolare su una possibile terapia di rechallenge con farmaci anti-EGFR a seguito di un periodo di intervallo con sospensione degli stessi.<sup>216</sup>

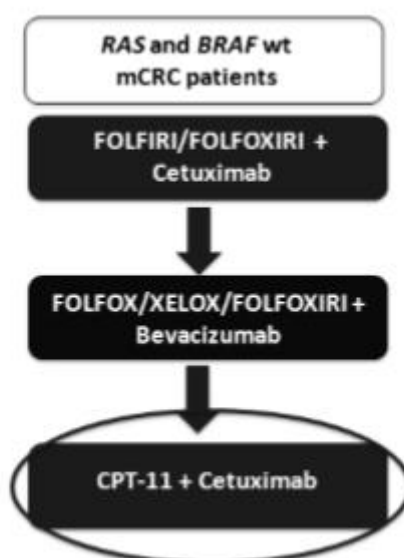
Santini et al. hanno condotto un'analisi retrospettiva multicentrica su pazienti che hanno avuto un beneficio clinico dopo una prima linea a base di cetuximab e irinotecano, e poi una progressione di malattia per la quale sono stati sottoposti ad una nuova linea di chemioterapia e infine, dopo una nuova progressione della malattia, sono stati ritrattati con lo stessa terapia a base di cetuximab e irinotecano. Sono stati arruolati in totale 39 pazienti, con un età media di 59 anni: il RR è stato del 53.8 % (95% CI 39.1%-63.7%) con 19 risposte parziali (PR 48.7%) e 2 risposte complete (CR 5.1%). La stabilità di malattia (SD) è stata raggiunta nel 35.9% dei pazienti (95% CI 24.7%-51.6%) per un controllo clinico complessivo della malattia dell'89.8%. La progressione si è presentata in soli 4 pazienti (10.2%). La PFS media è stata di 6.6 mesi (95% CI 4.1% a 9.1%). Se confrontati con la risposta ottenuta durante la prima terapia a base di cetuximab, 18 pazienti (46.1%) hanno presentato lo stesso tipo di risposte in termini di SD, PR o CR, durante il ritrattamento con cetuximab; 2 pazienti (5.1%) hanno invece avuto un miglioramento del risultato clinico rispetto alla prima linea, passando rispettivamente da PR a CR e da SD a PR. Una stabilità di malattia di almeno 6 mesi e la presenza di una risposta parziale nel corso della prima linea di terapia a base di cetuximab, hanno dimostrato giocare un ruolo importante nel predire un beneficio clinico nella terapia di rechallenge con cetuximab.<sup>217</sup>

Basandoci su questi dati biologici e clinici, abbiamo disegnato uno studio di fase II, a singolo braccio, con lo scopo di dimostrare prospetticamente che i pazienti *KRAS*, *NRAS* e *BRAF* wild-type che hanno risposto e poi sono progrediti ad una

prima linea di terapia a base di irinotecano e cetuximab, possono beneficiare ancora, dopo una seconda linea di terapia diversa dalla prima, di una terza linea di trattamento con cetuximab e irinotecano.

### 3.3 Disegno dello studio

Lo studio CRICKET è uno studio di fase II a singolo braccio, multicentrico condotto in 11 centri italiani, nel quale pazienti irinotecano-pretrattati con mCRC *KRAS*, *NRAS* e *BRAF* wild-type, progrediti dopo una prima linea di terapia a base di cetuximab e ad una seconda linea con FOLFOX/XELOX/FOLFOXIRI + bevacizumab, sono candidati a ricevere un rechallenge di terza linea con cetuximab e irinotecano (CPT-11).



### 3.4 Obiettivi dello studio

L'end-point primario dello studio è quello di valutare l'*attività* del trattamento di terza linea in questione, in termini di Overall Respons Rate (ORR), definita come la percentuale dei pazienti, relativa alla totalità dei soggetti arruolati nello studio, che giungono ad una risposta completa (CR) o parziale (PR), secondo i criteri RECIST v1.1 (Response Evaluation Criteria in Solid Tumor). Sulla base di tali criteri, negli studi di fase II che hanno come end-point primario il RR, è necessario che la risposta venga confermata in due rivalutazioni TC successive.

Endpoints secondari includono:

- Progression-free survival (PFS), definita come il tempo dall'inizio della terapia fino alla prima documentazione di un oggettivo avanzamento della malattia o morte dovuta a una qualsiasi causa. Lo stato della malattia verrà valutato sempre secondo i criteri RECIST 1.1.;
- Overall survival (OS) è definita come il tempo dall'inizio della terapia fino alla data della morte dovuta a una qualsiasi causa;
- Profilo di tossicità valutato come la percentuale di pazienti, relativo al totale soggetti registrati, che vanno incontro ad uno specifico evento avverso, secondo le linee guida del National Cancer Institute Common Toxicity V 4.03;
- Valutazione di potenziali biomarcatori predittivi e/o prognostici.

### **3.5 Considerazioni statistiche**

In accordo al disegno di Fleming single-stage, selezionando  $p_0$  (RR nell'ipotesi nulla) = 0.05, and  $p_1$  (RR nell'ipotesi alternativa) = 0.20, e considerando l'errore alpha (a 1 coda) e quello beta uguali a 0.05 e 0.20 rispettivamente, saranno necessari 27 pazienti. L'ipotesi nulla verrà rifiutata se almeno 4 pazienti avranno una risposta obiettiva.

### **3.6 Centri partecipanti e durata dello studio**

Al momento lo studio è attivo in 11 centri oncologici nelle seguenti città: Pisa, Roma (Campus Biomedico, Università la Sapienza, Roma Isola Tiberina, Roma Gemelli), Frosinone, Padova; Parma, Pontedera, Udine, Rimini

L'arruolamento dei pazienti e la raccolta dei dati sono centralizzati presso il Polo Oncologico Area Vasta Nord-Ovest – Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana (AOUP), Istituto Toscano Tumori (ITT). Il tempo di accrual pianificato è di 18 mesi, per una durata totale dello studio di 24 mesi.

### **3.7 Materiali e metodi**

Lo studio è stato svolto in accordo ai principi della dichiarazione di Helsinki dell'associazione medica mondiale.

### 3.7.1 Selezione dei pazienti

#### *Criteri di inclusione*

I pazienti sono stati selezionati all'interno dello studio secondo i seguenti criteri:

- diagnosi istologica di adenocarcinoma del colon *RAS* e *BRAF* wild type;
- Risposta ad una prima linea di terapia a base di irinotecano (FOLFIRI o FOLFOXIRI) e contenente cetuximab;
- PFS alla prima linea di terapia contenente cetuximab  $\geq 6$  mesi;
- Documentata progressione alla prima linea di terapia entro 4 settimane dall'ultima somministrazione di cetuximab secondo i criteri RECIST v1.1;
- Tempo tra la fine della terapia di prima linea e l'inizio della terza linea con cetuximab e irinotecano  $\geq 4$  mesi;
- Seconda linea di trattamento a base di oxaliplatino (FOLFOXIRI, FOLFOX e XELOX) in associazione a bevacizumab;
- documentata progressione alla seconda linea;
- Uomo o donna superiore a 18 anni;
- ECOG Performance Status  $\leq 2$ ;
- aspettativa di vita di almeno tre mesi;
- Adeguata funzionalità ematologica, epatica e renale valutata entro 14 giorni dall'inizio del trattamento in studio;
- Donne fertili devono avere test di gravidanza negativo alla visita basale. Per questo studio sono considerate fertili tutte le donne dopo la pubertà, eccetto quelle che sono in menopausa da almeno 12 mesi, quelle chirurgicamente sterili o sessualmente inattive;
- I pazienti e i loro partner devono evitare la gravidanza durante il trattamento e fino a 6 mesi dopo l'ultima somministrazione. I soggetti maschili con partner fertili devono quindi accettare l'uso di un adeguato metodo contraccettivo approvato dallo sperimentatore (es. doppia barriera o singola barriera con spermicida e dispositivo intrauterino). La contraccezione è richiesta 2 settimane prima dell'inizio del trattamento e fino a 6 mesi dopo l'ultima somministrazione;
- consenso informato scritto.



### Criteria di esclusione

- infezioni in atto non controllate o coagulazione intravascolare disseminata
- storia passata o corrente di altri tumori oltre a quello del colon retto, con l'eccezione di basaliomi o carcinomi squamocellulari della cute o carcinoma in situ della cervice trattati in modo curativo;
- donne < 12 mesi (dall'ultima mestruazione) e uomo in età fertile che non utilizzano adeguati metodi contraccettivi;
- donne in stato di gravidanza e allattamento;
- precedente reazione allergica di grado 3 o 4 correlata all'infusione di cetuximab.

### 3.7.2 Trattamento e riduzione della dose

I pazienti arruolati nello studio ricevono cetuximab più irinotecano secondo il seguente schema: cetuximab 500 mg/mq ev in 1-h ogni 2 settimane, seguito da Irinotecano 180 mg/mq ev 1-h ogni 2 settimane (o in accordo alla scelta dell'investigatore nel miglior interesse del paziente alla precedente dose tollerata, ma  $\geq 130$  mg/mq). Il trattamento verrà continuato fino a progressione della malattia, morte, tossicità inaccettabile o ritiro del consenso. In caso di tossicità inaccettabile di irinotecano, cetuximab può essere continuato in monoterapia. Allo stesso modo, se cetuximab viene sospeso per tossicità, irinotecano può essere continuato in monoterapia a discrezione dell'investigatore. Vengono di seguito elencate le modifiche di dose di irinotecano e cetuximab da mettere in pratica in seguito alla comparsa di tossicità a tali farmaci.

<b>MODIFICAZIONI DI DOSE PER TOSSICITA' DOVUTE AD IRINOTECANO</b>		
<b>EVENTO ALL'INIZIO DI OGNI CICLO</b>	<b>GRADO</b>	<b>MODIFICA</b>
<i>Globuli bianchi</i>	<3.000/mm <sup>3</sup>	Sospendere fino a risoluzione
<i>Neutrofili</i>	<1.000/mm <sup>3</sup>	
<i>Piastrine</i>	<100.000/mm <sup>3</sup>	
<i>Diarrea</i>	$\geq 1$	
<i>Mucosite</i>	$\geq 1$	
<i>Altre tossicità non ematologiche</i>	$\geq 2$	
<b>EVENTI PRECEDENTI</b>	<b>GRADO</b>	<b>MODIFICA</b>
<i>Neutropenia &gt;5 giorni</i>	4	75%
<i>Neutropenia febbrile</i>	4	
<i>Piastrinopenia</i>	$\geq 3$	
<i>Diarrea</i>	3	75%
<i>Diarrea</i>	4	50%

<b>MODIFICAZIONI DI DOSE PER TOSSICITA' DOVUTE A CETUXIMAB</b>		
<b>EVENTO</b>	<b>GRADO</b>	<b>MODIFICA</b>
Tossicità cutanea o ungueale – <i>Prima occorrenza</i>	3 o 4	Sospendere cetuximab fino a grado ≤ 2 e riprendere al 100% della dose
Tossicità cutanea o ungueale in pazienti trattati al 100% o 80% della dose – <i>Ricorrenza</i>	3 o 4	Riprendere cetuximab all' 80% o al 60% della dose rispettivamente
Ipomagnesemia sintomatica – <i>Prima occorrenza</i>		Sospendere cetuximab fino a risoluzione e riprendere al 100% della dose Supplementazione di Mg <sup>++</sup>
Ipomagnesemia sintomatica in pazienti trattati al 100% o 80% della dose – <i>Ricorrenza</i>		Riprendere cetuximab all' 80% o al 60% della dose rispettivamente Supplementazione di Mg <sup>++</sup>
Diarrea – <i>Prima occorrenza</i>	3 o 4	Sospendere cetuximab fino a risoluzione e riprendere al 100% della dose
Diarrea in pazienti trattati al 100% o 80% della dose – <i>Ricorrenza</i>	3 o 4	Riprendere cetuximab all' 80% o al 60% della dose rispettivamente
Qualsiasi tossicità non ematologica	4	Sospendere cetuximab fino a risoluzione

### 3.7.3 Procedure dello studio

Lo studio prevede i seguenti esami laboratoristici, strumentali, e valutazioni cliniche nelle varie fasi dello studio.

#### *Basale:*

- Anamnesi, ECOG PS, esame obiettivo e segni vitali;
- Emocromo e chimica completa;
- TC torace/addome;
- Consenso informato scritto;
- Raccolta di blocchetto in paraffina (o 10 vetrini con spessore e polarità convenzionali per IHC e 10 vetrini da 10 micron per biologia molecolare) del tumore primitivo e/o delle sedi metastatiche. Il tessuto tumorale verrà mandato al centro di coordinamento (U.O Oncologia medica 2 Universitaria-AOUP) per la raccolta e anonimizzazione. Il DNA verrà estratto tramite Kit standard commerciali e analizzato tramite Pyrosequencing or Sequenom MassARRAY;
- Prima della somministrazione del primo ciclo: raccolta di campioni di sangue intero e di plasma per le analisi di farmacogenetica,

farmacodinamica e DNA circolante. I campioni di sangue intero e di plasma devono essere immediatamente mantenuti a 0-4 °C (per non più di 45 minuti) e poi conservati a - 20° e - 80°, rispettivamente.

*Durante il trattamento - Ogni due settimane:*

- Prima della somministrazione del secondo ciclo (i.e. ciclo 1 giorno 14): raccolta di campioni di plasma per le analisi di farmacodinamica. I campioni di plasma devono essere immediatamente mantenuti a 0-4°C (per non più di 45 minuti) e poi conservati a -20°C e - 80°C;
- Chimica parziale (bilirubina totale, AST, ALT, fosfatasi alcalina, creatinina) ed emocromo;
- Valutazione delle tossicità;
- ECOG PS, esame obiettivo (incluso il peso).

*Durante e dopo il trattamento fino a progressione – Ogni 8 settimane:*

- Alla prima valutazione TC e alla progressione: raccolta di campioni di plasma per le analisi di farmacodinamica e DNA circolante. I campioni di plasma devono essere immediatamente mantenuti a 0-4°C (per non più di 45 minuti) e poi conservati a -20°C e -80°C
- Valutazione di malattia (RECIST v1.1)
- Chimica completa : bilirubina totale, AST, ALT, fosfatasi alcalina, proteine totali, albumina, LDH, creatinina, elettroliti , aPTT, INR, CEA, CA19.9.

#### **3.7.4 Analisi del DNA tumorale libero circolante**

Il trattamento con terapie target potrebbe essere in grado esercitare una pressione di selezione positiva su cloni di cellule tumorali resistenti al farmaco stesso, responsabili del fallimento della terapia. Pertanto, il trattamento dovrebbe richiedere un monitoraggio periodico finalizzato all'identificazione precoce della resistenza a livello molecolare, a seguito di mutazioni di *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* e *PIK3CA* .Il protocollo dello studio prevede la raccolta di un campione di plasma (5-10 ml) prima del trattamento (basale), dopo la somministrazione del secondo ciclo, alla prima TC e alla progressione. Il DNA tumorale libero circolante (Circulating cell-free tumor DNA analysis, cftDNA), viene estratto dal plasma utilizzando il QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) <sup>218</sup> e conservato a -20°C fino all'analisi dello stesso ,tramite droplet digital PCR (BioRad).

### 3.8 Risultati

#### *Caratteristiche dei pazienti*

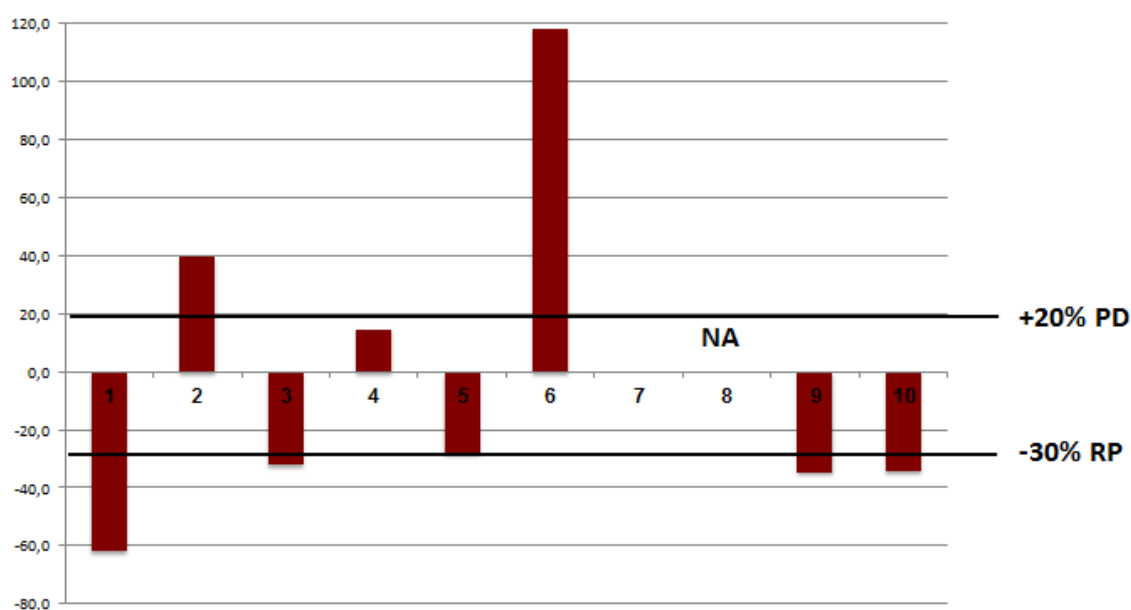
Da Agosto 2014 ad oggi, sono stati arruolati nello studio 11 pazienti, 8 maschi e 3 femmine, con età mediana di 70 anni (range 45-77), ECOG Performance Status 0/1-2 rispettivamente in 8 e 3 pazienti. Il tumore primitivo era localizzato al colon destro in 4 pazienti, colon sinistro in altri 4 e retto extraperitoneale in 2 casi. Due pazienti presentavano il primitivo in sede al momento dell'arruolamento nello studio. La malattia metastatica era sincrona in 8 pazienti, e tutti e 3 i pazienti con malattia metacrona avevano ricevuto una precedente terapia adiuvante con oxaliplatino. Due pazienti presentavano malattia limitata al fegato e 7 pazienti avevano multiple sedi metastatiche. Informazioni demografiche e altre caratteristiche di base dei pazienti sono riassunte nella tabella sottostante.

<b>Caratteristiche pazienti</b>		<b>N=11</b>
<i>Età</i>	Media	70
	Range	(45 – 70)
<i>Sesso</i>	Maschi	8
	Femmine	3
<i>ECOG PS</i>	0	8
	1-2	3
<i>Sede primitivo</i>	Destra	4
	Sinistra	4
	Retto	3
<i>Metastasi</i>	Sincrone	8
	Metacrone	3
<i>CT adiuvante</i>	Si	3
	No	8
<i>Oxaliplatino adiuvante</i>		3
<i>Resezione tumore primitivo</i>	Si	9
	No	2
<i>Metastasi multiple</i>		7
<i>Malattia limitata al fegato</i>		2

### Attività

La miglior risposta osservata su 9 pazienti attualmente valutabili, è stata la seguente: 4 risposte parziali (RP), 2 stabilità di malattia (SD), 3 progressioni di malattia (PD). Tre RP sono state confermate alla seconda rivalutazione TC secondo i criteri RECIST v1.1. Un paziente non è stato valutato per la risposta perchè deceduto prima della rivalutazione TC in seguito a sepsi. L'undicesimo paziente arruolato non ha ancora eseguito la prima rivalutazione TC. Al momento i dati relativi agli end-points secondari di PFS, OS e di safety non sono disponibili e verranno valutati quando il follow up sarà più esteso.

Di seguito viene presentato il waterfall plot relativo alle risposte in termini percentuali, secondo i criteri RECIST v1.1



### DNA tumorale libero circolante basale

Al momento sono disponibili i dati relativi all'analisi basale su 10 degli 11 pazienti arruolati nello studio. Sono state ricercate le seguenti mutazioni: *KRAS* G12D, *KRAS* G12V, *KRAS* G12C, *KRAS* G12A, *KRAS* G12R, *KRAS* G12S, *BRAF* V600E, *EGFR* S492R. Le analisi del cftDNA ai vari timepoints previsti dal protocollo sono in corso. Otto pazienti sono risultati wild-type per tutte le mutazioni

analizzate, mentre in 2 pazienti è stata individuata la mutazione G12D di *KRAS*. Entrambi questi pazienti sono rapidamente progrediti senza beneficiare del trattamento di rechallenge.

<b>Codice paziente</b>	<b>Cft DNA basale</b>	<b>Miglior risposta</b>
MAE01	Wild - type	RP
LIV02	<b>KRAS G12D</b>	<b>PD</b>
NOG03	Wild - type	RP
DTA04	Wild - type	PD
CAP05	Wild - type	SD
POP06	<b>KRAS G12D</b>	<b>PD</b>
PAG07	Wild – type	SD
PIG08	Wild – type	NA
SAM09	Wild – type	RP
DEV10	Wild – type	RP

### 3.9 Discussione

I risultati derivanti dall'analisi retrospettiva di Santini, e i numerosi dati sullo studio del DNA tumorale libero circolante in corso di trattamento con anti-EGFR nei pazienti con mCRC *RAS* wild-type, forniscono una solida base al concetto di eterogeneità tumorale e un conseguente forte razionale per una possibile terapia di rechallenge con cetuximab in pazienti che ne abbiano beneficiato precedentemente. Tuttavia allo stato attuale delle conoscenze non abbiamo una validazione prospettica che ci permetta di farlo nella normale pratica clinica secondo i principi dell'evidence-based medicine. Lo studio di fase II CRICKET si è posto come obiettivo primario, proprio quello di valutare l'attività di una terapia di rechallenge con cetuximab e irinotecano in pazienti selezionati con dei criteri di inclusione molto stringenti. Nello studio infatti possono essere arruolati solo pazienti *RAS* e *BRAF* wild-type che abbiano beneficiato di una prima linea contenente cetuximab per almeno 6 mesi, e che siano progrediti entro quattro settimane dall'ultima somministrazione di cetuximab, in modo da definire una reale popolazione che abbia beneficiato dell'anti-EGFR e che allo stesso tempo abbia successivamente davvero sviluppato una resistenza acquisita a cetuximab. I pazienti inoltre devono essere progrediti ad una seconda linea a base di chemioterapia contenente oxaliplatino (FOLFOX, XELOX, FOLFOXIRI) e bevacizumab. Dall'inizio dello studio nell'agosto del 2014 ad oggi sono stati arruolati 11 pazienti. La miglior risposta osservata su 9 pazienti attualmente valutabili, è stata la seguente: 4 risposte parziali (RP), 2 stabilità di malattia (SD), 3 progressioni di malattia (PD). Tre RP sono state confermate alla seconda rivalutazione TC secondo i criteri RECIST v1.1. Un paziente non è stato valutato per la risposta perchè deceduto prima della rivalutazione TC in seguito a sepsi. L'undicesimo paziente arruolato non ha ancora eseguito la prima rivalutazione TC. Se verrà confermata una quarta risposta in due rivalutazioni TC successive secondo i criteri RECIST v1.1 l'end-point primario verrà raggiunto. Al momento i dati relativi agli end-points secondari di PFS, OS e di safety non sono disponibili e verranno valutati quando il follow up sarà più esteso e la popolazione di studio più ampia. Contemporaneamente allo studio CRICKET, il gruppo francese GERCOR ha avviato nel gennaio del 2015 uno studio "gemello" di fase II, lo studio REGAIN (Rechallenge of Cetuximab Combined With Irinotecan as Third-line Chemotherapy

in Patients With Metastatic Colorectal Cancer), con lo scopo di valutare anch'esso l'attività del rechallenge di cetuximab e irinotecano in pazienti con criteri di inclusione simili a quelli dello studio CRICKET. Attualmente lo studio è ancora ongoing e i dati non sono ancora disponibili. Una volta terminati, è prevista una pooled analisi degli studi CRICKET e REGAIN.

L'analisi del DNA tumorale libero circolante (cftDNA) *basale* mediante biopsia liquida dei pazienti in studio, ha fornito dei dati interessanti. Sono state ricercate le seguenti mutazioni: *KRAS* G12D, *KRAS* G12V, *KRAS* G12C, *KRAS* G12A, *KRAS* G12R, *KRAS* G12S, *BRAF* V600E, *EGFR* S492R. Al momento è stata svolta l'analisi del cftDNA basale di 10 degli 11 pazienti arruolati nello studio mentre le analisi del cftDNA ai vari timepoints previsti dal protocollo sono in corso. Le analisi hanno mostrato che su 10 pazienti, 8 sono risultati *RAS* wild-type, mentre in 2 pazienti è stata riscontrata la mutazione G12D di *KRAS*. Si è osservato che entrambi i pazienti *RAS* mutati sono andati in progressione senza beneficiare del trattamento. Sempre più prove stanno dimostrando il ruolo positivo della biopsia liquida come strumento utile al monitoraggio della dinamicità evolutiva dello stato molecolare dei tumori coloretali *RAS* wild-type in corso dei trattamenti. Al momento l'analisi del cftDNA rimane confinata all'interno degli studi clinici e di laboratorio, ma non è escluso che la biopsia liquida possa in futuro entrare a fare parte della normale pratica clinica, in un'ottica di migliore personalizzazione delle terapie.

Per concludere, nonostante siano ancora parziali, i dati dello studio CRICKET si stanno dimostrando promettenti. Una certa percentuale di pazienti *KRAS*, *NRAS* e *BRAF* wild-type che hanno risposto e poi sono progrediti ad una prima linea di terapia a base di irinotecano e cetuximab, sembrano beneficiare ancora, dopo una seconda linea di terapia diversa dalla prima, di una terza linea di trattamento con cetuximab e irinotecano. Lo studio è attualmente ongoing, per cui dati definitivi relativi all'attività ed efficacia del trattamento saranno disponibili in futuro. L'analisi del cftDNA mediante biopsia liquida, seppur ancora molto preliminare, sembra suggerire che pazienti con evidenza di mutazione di *KRAS* non beneficiano del rechallenge con cetuximab, seppure l'analisi molecolare sul tessuto tumorale abbia evidenziato una malattia *RAS* e *BRAF* wild-type.



#### **4. Conclusioni**

Sulla base di quanto osservato, lo studio CRICKET si colloca perfettamente in un'epoca in cui il tumore non è più visto come un'unica entità imm modificabile, piuttosto come un'entità biologica eterogenea dal punto di vista cellulare e molecolare pronta a modificarsi nel corso dei trattamenti, secondo gli stessi principi Darwinistici della selezione naturale della specie. Il tumore pertanto potrebbe di nuovo tornare suscettibile a farmaci già utilizzati nel corso della storia naturale della malattia, come cetuximab, riuscendo in questo modo a superare la resistenza acquisita in precedenza. Considerando tale concetto di eterogeneità tumorale, la biopsia liquida si sta consolidando sempre più come un utile strumento in grado di monitorare l'evoluzione biomolecolare dei tumori in corso di trattamento, sebbene il suo routinario utilizzo nella normale pratica clinica sembri ancora lontano. In un'ottica di ottimizzazione e personalizzazione delle terapie, possiamo dunque affermare che lo studio CRICKET si configura uno studio innovativo nell'ambito della moderna "precision oncology".

## BIBLIOGRAFIA

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* 2015; **65**(2): 87-108.
2. Doubeni CA, Laiyemo AO, Major JM, et al. Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: an analysis of more than a half million adults in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Cancer* 2012; **118**(14): 3636-44.
3. Kohler BA, Sherman RL, Howlader N, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. *Journal of the National Cancer Institute* 2015; **107**(6): djv048.
4. Lee BY, Sonnenberg A. Time trends of mortality from colorectal cancer in the United States: a birth-cohort analysis. *JAMA internal medicine* 2013; **173**(12): 1148-50.
5. NIH: National Cancer Institute DoCCaPS, Surveillance Research Program, Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. SEER\*Stat Database: Incidence-SEER 9 Regs Research Data (with SEER Delay Factors), Nov. 2014 Sub (1973-2012). 2015. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html> (accessed 02.2016 2016).
6. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians* 2015; **65**(1): 5-29.
7. Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2009; **18**(6): 1688-94.
8. AIOM. I numeri del cancro in Italia 2015. Brescia: Intermedia editore; 2015.
9. Chan AT, Giovannucci EL. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; **138**(6): 2029-43 e10.
10. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins e Cotran. Le basi patologiche delle malattie. 7.a ed. Milano: Elsevier; 2006.
11. Chao A, Thun MJ, Connell CJ, et al. Meat consumption and risk of colorectal cancer. *Jama* 2005; **293**(2): 172-82.
12. Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *The Lancet Oncology* 2015; **16**(16): 1599-600.
13. Bingham SA, Day NE, Luben R, et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet (London, England)* 2003; **361**(9368): 1496-501.
14. Aune D, Chan DS, Lau R, et al. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ (Clinical research ed)* 2011; **343**: d6617.
15. World Cancer Research Fund. Colorectal Cancer 2011 Report Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Colorectal Cancer. 2011. <http://www.wcrf.org/int/research-we-fund/continuous-update-project-findings-reports/colorectal-bowel-cancer> (accessed 02.2016 2016).
16. Karahalios A, English DR, Simpson JA. Weight change and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *American journal of epidemiology* 2015; **181**(11): 832-45.
17. De Bruijn KM, Arends LR, Hansen BE, Leeflang S, Ruiters R, van Eijck CH. Systematic review and meta-analysis of the association between diabetes mellitus and incidence and mortality in breast and colorectal cancer. *The British journal of surgery* 2013; **100**(11): 1421-9.
18. Botteri E, Iodice S, Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2008; **134**(2): 388-95.
19. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *Jama* 2008; **300**(23): 2765-78.

20. Abrams JA, Terry MB, Neugut AI. Cigarette smoking and the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Gastroenterology* 2008; **134**(2): 617-9.
21. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2011; **22**(9): 1958-72.
22. Burt RW, DiSario JA, Cannon-Albright L. Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. *Annual review of medicine* 1995; **46**: 371-9.
23. Ponz de Leon M, Sassatelli R, Benatti P, Roncucci L. Identification of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the general population. The 6-year experience of a population-based registry. *Cancer* 1993; **71**(11): 3493-501.
24. Locker GY, Lynch HT. Genetic factors and colorectal cancer in Ashkenazi Jews. *Familial cancer* 2004; **3**(3-4): 215-21.
25. Hes FJ, Nielsen M, Bik EC, et al. Somatic APC mosaicism: an underestimated cause of polyposis coli. *Gut* 2008; **57**(1): 71-6.
26. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, et al. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *The New England journal of medicine* 2003; **348**(9): 791-9.
27. Parry S, Win AK, Parry B, et al. Metachronous colorectal cancer risk for mismatch repair gene mutation carriers: the advantage of more extensive colon surgery. *Gut* 2011; **60**(7): 950-7.
28. Jenkins MA, Dowty JG, Ait Ouakrim D, et al. Short-term risk of colorectal cancer in individuals with lynch syndrome: a meta-analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2015; **33**(4): 326-31.
29. Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *Jama* 2005; **293**(16): 1979-85.
30. Mensenkamp AR, Vogelaar IP, van Zelst-Stams WA, et al. Somatic mutations in MLH1 and MSH2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in Lynch syndrome-like tumors. *Gastroenterology* 2014; **146**(3): 643-6 e8.
31. Kempers MJ, Kuiper RP, Ockeloen CW, et al. Risk of colorectal and endometrial cancers in EPCAM deletion-positive Lynch syndrome: a cohort study. *The Lancet Oncology* 2011; **12**(1): 49-55.
32. Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Jarvinen HJ. Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *International journal of cancer Journal international du cancer* 1995; **64**(6): 430-3.
33. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *The New England journal of medicine* 1990; **323**(18): 1228-33.
34. Rutter MD. Surveillance programmes for neoplasia in colitis. *Journal of gastroenterology* 2011; **46 Suppl 1**: 1-5.
35. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA: a cancer journal for clinicians* 2010; **60**(5): 277-300.
36. Schoenfeld P, Cash B, Flood A, et al. Colonoscopic screening of average-risk women for colorectal neoplasia. *The New England journal of medicine* 2005; **352**(20): 2061-8.
37. Short MW, Layton MC, Teer BN, Domagalski JE. Colorectal cancer screening and surveillance. *American family physician* 2015; **91**(2): 93-100.
38. Platz EA, Willett WC, Colditz GA, Rimm EB, Spiegelman D, Giovannucci E. Proportion of colon cancer risk that might be preventable in a cohort of middle-aged US men. *Cancer causes & control : CCC* 2000; **11**(7): 579-88.
39. Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE, et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet (London, England)* 2010; **376**(9754): 1741-50.
40. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, 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.
41. Lieberman DA. Clinical practice. Screening for colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 2009; **361**(12): 1179-87.
  42. Ciardiello F, Orditura M, De Vita F, et al. *Oncologia medica*. Napoli: Idelson-Gnocchi; 2013.
  43. Richter S. Fecal DNA screening in colorectal cancer. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie* 2008; **22**(7): 631-3.
  44. Atkin WS, Cook CF, Cuzick J, et al. Single flexible sigmoidoscopy screening to prevent colorectal cancer: baseline findings of a UK multicentre randomised trial. *Lancet (London, England)* 2002; **359**(9314): 1291-300.
  45. Winawer SJ, Zauber AG, O'Brien MJ, et al. Randomized comparison of surveillance intervals after colonoscopic removal of newly diagnosed adenomatous polyps. The National Polyp Study Workgroup. *The New England journal of medicine* 1993; **328**(13): 901-6.
  46. European Colorectal Cancer Screening Guidelines Working G, von Karsa L, Patnick J, 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.
  47. 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.
  48. Osservatorio Nazionale Screening. Toscana: screening coloretale. <http://www.osservatorionazionale screening.it/node/89> (accessed 02.2016 2016).
  49. Schoen RE, Pinsky PF, Weissfeld JL, et al. Colorectal-cancer incidence and mortality with screening flexible sigmoidoscopy. *The New England journal of medicine* 2012; **366**(25): 2345-57.
  50. AIOM. Linee guida. Tumori del colon retto. 2015. [http://www.aiom.it/C\\_Common/Download.asp?file=/Site\\$/files/doc/lg/2015\\_lg\\_aiom\\_colon-retto.pdf](http://www.aiom.it/C_Common/Download.asp?file=/Site$/files/doc/lg/2015_lg_aiom_colon-retto.pdf) (accessed 02.2016 2016).
  51. Barrow P, Khan M, Laloo 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.
  52. Shen L, Toyota M, Kondo Y, et al. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; **104**(47): 18654-9.
  53. Lassmann S, Weis R, Makowiec F, et al. Array CGH identifies distinct DNA copy number profiles of oncogenes and tumor suppressor genes in chromosomal- and microsatellite-unstable sporadic colorectal carcinomas. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 2007; **85**(3): 293-304.
  54. Prall F, Nizze H, Barten M. Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma. *Histopathology* 2005; **47**(1): 17-24.
  55. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, et al. Harrison. Principi di medicina interna. 18.a ed. Milano: CEA; 2012.
  56. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, et al. Colorectal cancer. *Lancet (London, England)* 2010; **375**(9719): 1030-47.
  57. 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.
  58. American Joint Committee on Cancer. Colon and Rectum Cancer Staging. 2010. <http://cancerstaging.org/references-tools/quickreferences/Documents/ColonLarge.pdf> (accessed 02.2016 2016).
  59. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart A. Revised tumor and node categorization for rectal cancer based on surveillance, epidemiology, and end

- results and rectal pooled analysis outcomes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010; **28**(2): 256-63.
60. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart AK. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010; **28**(2): 264-71.
61. Taylor AJ, Youker JE. Imaging in colorectal carcinoma. *Seminars in oncology* 1991; **18**(2): 99-110.
62. Horton KM, Abrams RA, Fishman EK. Spiral CT of colon cancer: imaging features and role in management. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* 2000; **20**(2): 419-30.
63. Hundt W, Braunschweig R, Reiser M. Evaluation of spiral CT in staging of colon and rectum carcinoma. *European radiology* 1999; **9**(1): 78-84.
64. Koh JL, Yan TD, Glenn D, Morris DL. Evaluation of preoperative computed tomography in estimating peritoneal cancer index in colorectal peritoneal carcinomatosis. *Annals of surgical oncology* 2009; **16**(2): 327-33.
65. 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.
66. 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.
67. Bast RC, Jr., Ravdin P, Hayes DF, et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2001; **19**(6): 1865-78.
68. Sugarbaker PH, Corlew S. Influence of surgical techniques on survival in patients with colorectal cancer. *Diseases of the colon and rectum* 1982; **25**(6): 545-57.
69. Herfarth C, Runkel N. [Surgical standards in primary colon cancer]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 1994; **65**(6): 514-23.
70. Killeen S, Mannion M, Devaney A, Winter DC. Complete mesocolic resection and extended lymphadenectomy for colon cancer: a systematic review. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 2014; **16**(8): 577-94.
71. Touloumtzidis A, Sostmann B, Hilgers N, 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.
72. Heald RJ, Moran BJ, Ryall RD, Sexton R, MacFarlane JK. Rectal cancer: the Basingstoke experience of total mesorectal excision, 1978-1997. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)* 1998; **133**(8): 894-9.
73. Moore HG, Riedel E, Minsky BD, 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.
74. Andreola S, Leo E, Belli F, 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.
75. 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.
76. Enker WE. Total mesorectal excision--the new golden standard of surgery for rectal cancer. *Annals of medicine* 1997; **29**(2): 127-33.
77. Yoon HH, Tougeron D, Shi Q, et al. KRAS codon 12 and 13 mutations in relation to disease-free survival in BRAF-wild-type stage III colon cancers from an adjuvant

- chemotherapy trial (N0147 alliance). *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014; **20**(11): 3033-43.
78. Sobrero A. Should adjuvant chemotherapy become standard treatment for patients with stage II colon cancer? For the proposal. *The Lancet Oncology* 2006; **7**(6): 515-6.
79. Kohne CH. Should adjuvant chemotherapy become standard treatment for patients with stage II colon cancer? Against the proposal. *The Lancet Oncology* 2006; **7**(6): 516-7.
80. Hutchins G, Southward K, Handley K, et al. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011; **29**(10): 1261-70.
81. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010; **28**(20): 3219-26.
82. Grem JL, Allegra CJ. Toxicity of levamisole and 5-fluorouracil in human colon carcinoma cells. *Journal of the National Cancer Institute* 1989; **81**(18): 1413-7.
83. Wolmark N, Fisher B, Rockette H, 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.
84. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, et al. Fluorouracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: a final report. *Annals of internal medicine* 1995; **122**(5): 321-6.
85. Porschen R, Bermann A, Loffler T, et al. Fluorouracil plus leucovorin as effective adjuvant chemotherapy in curatively resected stage III colon cancer: results of the trial adjCCA-01. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2001; **19**(6): 1787-94.
86. Wolmark N, Rockette H, Mamounas E, et al. Clinical trial to assess the relative efficacy of fluorouracil and leucovorin, fluorouracil and levamisole, and fluorouracil, leucovorin, and levamisole in patients with Dukes' B and C carcinoma of the colon: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-04. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1999; **17**(11): 3553-9.
87. Wolmark N, Rockette H, Fisher B, et al. The benefit of leucovorin-modulated fluorouracil as postoperative adjuvant therapy for primary colon cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol C-03. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1993; **11**(10): 1879-87.
88. O'Connell MJ, Mailliard JA, Kahn MJ, et al. Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1997; **15**(1): 246-50.
89. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *Lancet (London, England)* 1995; **345**(8955): 939-44.
90. O'Connell MJ, Laurie JA, Kahn M, et al. Prospectively randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy in patients with high-risk colon cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1998; **16**(1): 295-300.
91. Haller DG, Catalano PJ, Macdonald JS, et al. Phase III study of fluorouracil, leucovorin, and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: final report of Intergroup 0089. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005; **23**(34): 8671-8.
92. Dencausse Y, Hartung G, Sturm J, et al. Adjuvant chemotherapy in stage III colon cancer with 5-fluorouracil and levamisole versus 5-fluorouracil and leucovorin. *Onkologie* 2002; **25**(5): 426-30.

93. Poplin EA, Benedetti JK, Estes NC, et al. Phase III Southwest Oncology Group 9415/Intergroup 0153 randomized trial of fluorouracil, leucovorin, and levamisole versus fluorouracil continuous infusion and levamisole for adjuvant treatment of stage III and high-risk stage II colon cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005; **23**(9): 1819-25.
94. Kohne CH, Bedenne L, Carrato A, et al. A randomised phase III intergroup trial comparing high-dose infusional 5-fluorouracil with or without folinic acid with standard bolus 5-fluorouracil/folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: the Pan-European Trial in Adjuvant Colon Cancer 2 study. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2013; **49**(8): 1868-75.
95. Twelves C, Wong A, Nowacki MP, et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *The New England journal of medicine* 2005; **352**(26): 2696-704.
96. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *The New England journal of medicine* 2004; **350**(23): 2343-51.
97. Kuebler JP, Wieand HS, O'Connell MJ, 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.
98. Schmoll HJ, Tabernero J, Maroun J, et al. Capecitabine Plus Oxaliplatin Compared With Fluorouracil/Folinic Acid As Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer: Final Results of the NO16968 Randomized Controlled Phase III Trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2015; **33**(32): 3733-40.
99. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, 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.
100. Schmoll HJ, Cartwright T, Tabernero J, et al. Phase III trial of capecitabine plus oxaliplatin as adjuvant therapy for stage III colon cancer: a planned safety analysis in 1,864 patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007; **25**(1): 102-9.
101. Chung KY, Saltz LB. Adjuvant therapy of colon cancer: current status and future directions. *Cancer journal (Sudbury, Mass)* 2007; **13**(3): 192-7.
102. Van Cutsem E, Labianca R, Bodoky G, 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.
103. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, 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.
104. Alberts SR, Sargent DJ, Nair S, 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.
105. Tsai WS, Hsieh PS, Yeh CY, 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.
106. Andre T, Boni C, Navarro M, 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.
107. Cortezoso L, Lopez-Fernandez LA. Pharmacogenetic markers of toxicity for chemotherapy in colorectal cancer patients. *Pharmacogenomics* 2012; **13**(10): 1173-91.

108. Amstutz U, Froehlich TK, Largiader CR. Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity. *Pharmacogenomics* 2011; **12**(9): 1321-36.
109. Toffoli G, Cecchin E, Corona G, et al. The role of UGT1A1\*28 polymorphism in the pharmacodynamics and pharmacokinetics of irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2006; **24**(19): 3061-8.
110. Toffoli G, Cecchin E, Gasparini G, et al. Genotype-driven phase I study of irinotecan administered in combination with fluorouracil/leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010; **28**(5): 866-71.
111. Bosset JF, Collette L, Calais G, et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *The New England journal of medicine* 2006; **355**(11): 1114-23.
112. Gerard JP, Azria D, Gourgou-Bourgade S, et al. Comparison of two neoadjuvant chemoradiotherapy regimens for locally advanced rectal cancer: results of the phase III trial ACCORD 12/0405-Prodige 2. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010; **28**(10): 1638-44.
113. Gerard JP, Conroy T, Bonnetain F, et al. Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: results of FFCD 9203. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2006; **24**(28): 4620-5.
114. Aschele C, Cionini L, Lonardi S, et al. Primary tumor response to preoperative chemoradiation with or without oxaliplatin in locally advanced rectal cancer: pathologic results of the STAR-01 randomized phase III trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011; **29**(20): 2773-80.
115. Gerard JP, Azria D, Gourgou-Bourgade S, et al. Clinical outcome of the ACCORD 12/0405 PRODIGE 2 randomized trial in rectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2012; **30**(36): 4558-65.
116. Hofheinz RD, Wenz F, Post S, et al. Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: a randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 2012; **13**(6): 579-88.
117. Glimelius B, Tiret E, Cervantes A, Arnold D, Group EGW. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2013; **24** **Suppl 6**: vi81-8.
118. Bosset JF, Calais G, Mineur L, et al. Fluorouracil-based adjuvant chemotherapy after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer: long-term results of the EORTC 22921 randomised study. *The Lancet Oncology* 2014; **15**(2): 184-90.
119. Hong YS, Nam BH, Kim KP, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin versus fluorouracil and leucovorin as adjuvant chemotherapy for locally advanced rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy (ADORE): an open-label, multicentre, phase 2, randomised controlled trial. *The Lancet Oncology* 2014; **15**(11): 1245-53.
120. Valentini V, van Stiphout RG, Lammering G, et al. Nomograms for predicting local recurrence, distant metastases, and overall survival for patients with locally advanced rectal cancer on the basis of European randomized clinical trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011; **29**(23): 3163-72.
121. Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians* 2014; **64**(2): 104-17.
122. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, 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.



123. Loupakis F, Cremolini C, Masi G, et al. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 2014; **371**(17): 1609-18.
124. Falcone A, Masi G, Allegrini G, et al. Biweekly chemotherapy with oxaliplatin, irinotecan, infusional Fluorouracil, and leucovorin: a pilot study in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2002; **20**(19): 4006-14.
125. Van Cutsem E, Twelves C, Cassidy J, et al. Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2001; **19**(21): 4097-106.
126. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet (London, England)* 2000; **355**(9209): 1041-7.
127. de Gramont A, Figuer A, Seymour M, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2000; **18**(16): 2938-47.
128. Colucci G, Gebbia V, Paoletti G, et al. Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005; **23**(22): 4866-75.
129. Tournigand C, Andre T, Achille E, 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.
130. Arkenau HT, Arnold D, Cassidy J, 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.
131. Kohne CH, De Greve J, Hartmann JT, 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.
132. Fuchs CS, Marshall J, Barrueco J. Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: updated results from the BICC-C study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008; **26**(4): 689-90.
133. 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.
134. Church TR. Screening for colorectal cancer--which strategy is the best? *Journal of the National Cancer Institute* 2011; **103**(17): 1282-3.
135. 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.
136. Falcone A, Allegrini G, Antonuzzo A, et al. Infusions of fluorouracil and leucovorin: effects of the timing and semi-intermittency of drug delivery. *Oncology* 1999; **57**(3): 195-201.
137. Falcone A, Di Paolo A, Masi G, et al. Sequence effect of irinotecan and fluorouracil treatment on pharmacokinetics and toxicity in chemotherapy-naïve metastatic colorectal cancer patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2001; **19**(15): 3456-62.

138. Masi G, Allegrini G, Cupini S, et al. First-line treatment of metastatic colorectal cancer with irinotecan, oxaliplatin and 5-fluorouracil/leucovorin (FOLFOXIRI): results of a phase II study with a simplified biweekly schedule. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2004; **15**(12): 1766-72.
139. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, 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.
140. Souglakos J, Androulakis N, Syrigos K, 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.
141. Lenz HJ, Stintzing S, Loupakis F. TAS-102, a novel antitumor agent: A review of the mechanism of action. *Cancer treatment reviews* 2015; **41**(9): 777-83.
142. Yoshino T, Mizunuma N, Yamazaki K, et al. TAS-102 monotherapy for pretreated metastatic colorectal cancer: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 2012; **13**(10): 993-1001.
143. Mayer RJ, Van Cutsem E, Falcone A, et al. Randomized trial of TAS-102 for refractory metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 2015; **372**(20): 1909-19.
144. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. 1989. *Biochemical and biophysical research communications* 2012; **425**(3): 540-7.
145. Grothey A, Galanis E. Targeting angiogenesis: progress with anti-VEGF treatment with large molecules. *Nature reviews Clinical oncology* 2009; **6**(9): 507-18.
146. Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nature medicine* 2001; **7**(9): 987-9.
147. Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, et al. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nature medicine* 2004; **10**(2): 145-7.
148. Ranpura V, Hapani S, Wu S. Treatment-related mortality with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis. *Jama* 2011; **305**(5): 487-94.
149. Yeh J, Frieze D, Martins R, Carr L. Clinical utility of routine proteinuria evaluation in treatment decisions of patients receiving bevacizumab for metastatic solid tumors. *The Annals of pharmacotherapy* 2010; **44**(6): 1010-5.
150. Hurwitz HI, Tebbutt NC, Kabbinavar F, et al. Efficacy and safety of bevacizumab in metastatic colorectal cancer: pooled analysis from seven randomized controlled trials. *The oncologist* 2013; **18**(9): 1004-12.
151. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 2004; **350**(23): 2335-42.
152. Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, 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.
153. Kabbinavar FF, Hambleton J, Mass RD, Hurwitz HI, Bergsland E, Sarkar S. Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005; **23**(16): 3706-12.
154. Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Hainsworth JD, et al. Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal

cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005; **23**(15): 3502-8.

155. Masi G, Loupakis F, Salvatore L, 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.

156. Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. *The Lancet Oncology* 2015; **16**(13): 1306-15.

157. Bennouna J, Sastre J, Arnold D, 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.

158. Masi G, Salvatore L, Boni 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; **26**(4): 724-30.

159. Taberero J, Van Cutsem E, Lakomy R, et al. Aflibercept versus placebo in combination with fluorouracil, leucovorin and irinotecan in the treatment of previously treated metastatic colorectal cancer: prespecified subgroup analyses from the VELOUR trial. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2014; **50**(2): 320-31.

160. Taberero J, Yoshino T, Cohn AL, et al. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study. *The Lancet Oncology* 2015; **16**(5): 499-508.

161. Wilhelm SM, Dumas J, Adnane L, 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.

162. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet (London, England)* 2013; **381**(9863): 303-12.

163. Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer* 2001; **92**(5): 1331-46.

164. Urban C, Anadkat MJ. A review of cutaneous toxicities from targeted therapies in the treatment of colorectal cancers. *Journal of gastrointestinal oncology* 2013; **4**(3): 319-27.

165. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 2009; **360**(14): 1408-17.

166. Van Cutsem E, Kohne CH, Lang I, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011; **29**(15): 2011-9.

167. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2011; **22**(7): 1535-46.

168. Bokemeyer C, Van Cutsem E, Rougier P, et al. Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer:

- pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2012; **48**(10): 1466-75.
169. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 2008; **359**(17): 1757-65.
170. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010; **28**(31): 4697-705.
171. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008; **26**(35): 5705-12.
172. Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *British journal of cancer* 2009; **101**(4): 715-21.
173. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 2013; **369**(11): 1023-34.
174. Van Cutsem E, Lenz HJ, Kohne CH, 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.
175. 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.
176. Garufi C, Torsello A, Tumolo S, et al. Cetuximab plus chronomodulated irinotecan, 5-fluorouracil, leucovorin and oxaliplatin as neoadjuvant chemotherapy in colorectal liver metastases: POCHER trial. *British journal of cancer* 2010; **103**(10): 1542-7.
177. Fornaro L, Lonardi S, Masi G, 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.
178. Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, 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.
179. Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M, et al. PEAK: a randomized, multicenter phase II study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2014; **32**(21): 2240-7.
180. Formica V, Roselli M. Targeted therapy in first line treatment of RAS wild type colorectal cancer. *World journal of gastroenterology : WJG* 2015; **21**(10): 2871-4.
181. Heskamp S, Boerman OC, Molkenboer-Kuennen JD, Oyen WJ, van der Graaf WT, van Laarhoven HW. Bevacizumab reduces tumor targeting of anti-epidermal growth factor and anti-insulin-like growth factor 1 receptor antibodies. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2013; **133**(2): 307-14.
182. Sobrero AF, Maurel J, Fehrenbacher L, 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.
183. Peeters M, Price TJ, Cervantes A, 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.
184. Peeters M, Oliner KS, Price TJ, et al. Analysis of KRAS/NRAS Mutations in a Phase III Study of Panitumumab with FOLFIRI Compared with FOLFIRI Alone as Second-line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2015; **21**(24): 5469-79.
185. Seymour MT, Brown SR, Middleton G, 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.
186. Ciardiello F, Normanno N, Maiello E, et al. Clinical activity of FOLFIRI plus cetuximab according to extended gene mutation status by next-generation sequencing: findings from the CAPRI-GOIM trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2014; **25**(9): 1756-61.
187. Grothey A, Sargent D. Overall survival of patients with advanced colorectal cancer correlates with availability of fluorouracil, irinotecan, and oxaliplatin regardless of whether doublet or single-agent therapy is used first line. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005; **23**(36): 9441-2.
188. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, 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.
189. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 2007; **357**(20): 2040-8.
190. Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. *Nature reviews Molecular cell biology* 2008; **9**(7): 517-31.
191. Janakiraman M, Vakiani E, Zeng Z, et al. Genomic and biological characterization of exon 4 KRAS mutations in human cancer. *Cancer research* 2010; **70**(14): 5901-11.
192. Fernandez-Medarde A, Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes & cancer* 2011; **2**(3): 344-58.
193. Forbes SA, Bindal N, Bamford S, et al. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic acids research* 2011; **39**(Database issue): D945-50.
194. Yokota T, Ura T, Shibata N, et al. BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer. *British journal of cancer* 2011; **104**(5): 856-62.
195. Tran B, Kopetz S, Tie J, et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2011; **117**(20): 4623-32.
196. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *The Lancet Oncology* 2010; **11**(8): 753-62.
197. Valtorta E, Misale S, Sartore-Bianchi A, et al. KRAS gene amplification in colorectal cancer and impact on response to EGFR-targeted therapy. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2013; **133**(5): 1259-65.
198. Mekenkamp LJ, Tol J, Dijkstra JR, et al. Beyond KRAS mutation status: influence of KRAS copy number status and microRNAs on clinical outcome to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *BMC cancer* 2012; **12**: 292.
199. Yonesaka K, Zejnullahu K, Okamoto I, et al. Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Science translational medicine* 2011; **3**(99): 99ra86.

200. Bardelli A, Corso S, Bertotti A, et al. Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer discovery* 2013; **3**(6): 658-73.
201. Prenen H, De Schutter J, Jacobs B, et al. PIK3CA mutations are not a major determinant of resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009; **15**(9): 3184-8.
202. Karapetis CS, Jonker D, Daneshmand M, et al. PIK3CA, BRAF, and PTEN status and benefit from cetuximab in the treatment of advanced colorectal cancer--results from NCIC CTG/AGITG CO.17. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014; **20**(3): 744-53.
203. Diaz-Rubio E, Gomez-Espana A, Massuti B, et al. Role of Kras status in patients with metastatic colorectal cancer receiving first-line chemotherapy plus bevacizumab: a TTD group cooperative study. *PloS one* 2012; **7**(10): e47345.
204. Misale S, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Siena S, Bardelli A. Resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer: from heterogeneity to convergent evolution. *Cancer discovery* 2014; **4**(11): 1269-80.
205. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England journal of medicine* 2012; **366**(10): 883-92.
206. Gattenlohner S, Etschmann B, Kunzmann V, et al. Concordance of KRAS/BRAF Mutation Status in Metastatic Colorectal Cancer before and after Anti-EGFR Therapy. *Journal of oncology* 2009; **2009**: 831626.
207. Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, Hartleb D, Stoecklein NH, Gabbert HE. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2010; **16**(3): 790-9.
208. Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* 2005; **24**(50): 7443-54.
209. Robertson EG, Baxter G. Tumour seeding following percutaneous needle biopsy: the real story! *Clinical radiology* 2011; **66**(11): 1007-14.
210. Hompes D, Ruers T. Review: incidence and clinical significance of Bevacizumab-related non-surgical and surgical serious adverse events in metastatic colorectal cancer. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 2011; **37**(9): 737-46.
211. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature reviews Cancer* 2011; **11**(6): 426-37.
212. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2001; **313**(1-2): 139-42.
213. Akca H, Demiray A, Yaren A, et al. Utility of serum DNA and pyrosequencing for the detection of EGFR mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer genetics* 2013; **206**(3): 73-80.
214. Misale S, Yaeger R, Hobor S, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012; **486**(7404): 532-6.
215. Diaz LA, Jr., Williams RT, Wu J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012; **486**(7404): 537-40.
216. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nature medicine* 2015; **21**(7): 795-801.
217. Santini D, Vincenzi B, Addeo R, et al. Cetuximab rechallenge in metastatic colorectal cancer patients: how to come away from acquired resistance? *Annals of*

*oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2012; **23**(9): 2313-8.

218. Casper ES, Green MR, Kelsen DP, et al. Phase II trial of gemcitabine (2,2'-difluorodeoxycytidine) in patients with adenocarcinoma of the pancreas. *Investigational new drugs* 1994; **12**(1): 29-34.

