



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

Tesi di laurea

**FOLFOXIRI più cetuximab nel trattamento di prima linea di
pazienti affetti da carcinoma coloretale metastatico *RAS* e
BRAF wild-type: risultati dello studio di fase II
randomizzato MACBETH**

Relatore

Prof. Alfredo Falcone

Candidata

Gemma Zucchelli

Anno Accademico 2014-2015

Sommario

Riassunto	4
Capitolo 1. Il tumore del colon-retto (CRC)	7
1.1 Epidemiologia	7
1.2 Eziologia e fattori di rischio	10
1.2.1 Fattori ambientali	10
1.2.2 Fattori genetici	14
1.3 Screening	18
1.4 Cenni di Anatomia Patologica	24
1.5 Stadiazione e prognosi	29
1.6 Presentazione clinica e diagnosi	33
Capitolo 2. Trattamento del tumore del colon-retto	39
2.1 Terapia della malattia localizzata	39
2.1.1 Cenni di terapia chirurgica	39
2.1.2 Cenni di chemioterapia adiuvante	43
2.2 Terapia della malattia metastatica	51
2.2.1 Approccio multidisciplinare alla malattia	51
2.2.1.1 Fattori clinici e molecolari	51
2.2.1.2 Resecabilità chirurgica	61
2.2.2 Scelta del trattamento farmacologico nella malattia non resecabile	73
2.2.2.1 Scelta dell'intensità	73
Terapia con doppiette	73
Terapia con tripletta	78
Monochemioterapia	80
2.2.2.2 Scelta del miglior farmaco biologico	82
Farmaci anti-angiogenici	82
Farmaci anti-EGFR	89
2.2.2.3 Trattamento di prima linea: un algoritmo terapeutico	98
Capitolo 3. FOLFOXIRI più cetuximab nel trattamento di prima linea di pazienti affetti da carcinoma coloretale metastatico <i>RAS</i> e <i>BRAF</i> wild-type: risultati dello studio di fase II randomizzato MACBETH	101
3.1 Background e rationale	101
3.2 Materiali e metodi	111
3.2.1 Selezione dei pazienti	111
3.2.2 Valutazione dello stato mutazionale di <i>RAS</i> e <i>BRAF</i>	111
3.3 Endpoint dello studio	113
3.4 Disegno dello studio e trattamento somministrato	115

3.5 Risultati e discussione.....	118
3.5.1 Caratteristiche della popolazione.....	118
3.5.2 Analisi di sopravvivenza	120
3.6 Conclusioni	126
Bibliografia.....	129

Riassunto

La prognosi dei pazienti con malattia metastatica da tumore del colon-retto è indubbiamente migliorata nell'arco degli ultimi anni, grazie al maggior utilizzo di trattamenti locoregionali (chirurgia, radioterapia, radiofrequenze) integrati con terapie sistemiche sempre più efficaci.

Complessivamente, nell'ambito della terapia del tumore del colon-retto metastatico, essendo le possibilità attuali numerosissime, risulta fondamentale l'individualizzazione della strategia terapeutica, basata fin da subito su una valutazione multidisciplinare, comprendente fattori clinici legati al paziente e alla sua malattia e fattori molecolari. Al momento, il passo cruciale in questo processo decisionale è rappresentato dalla scelta della "miglior intensità della chemioterapia", basata sulle fluoropirimidine, sia orali che endovenose, l'oxaliplatino e l'irinotecan, oltre che del "miglior farmaco biologico" tra quelli disponibili: gli anticorpi monoclonali anti-EGFR, cetuximab e panitumumab, e l'anti-angiogenico bevacizumab. La combinazione di una doppietta di chemioterapici (FOLFOX o FOLFIRI) e un farmaco biologico viene ritenuta un'opzione standard per la maggior parte dei pazienti. Tuttavia, recentemente, i risultati dello studio TRIBE hanno reso disponibile, in casi clinicamente selezionati, una nuova opzione terapeutica più intensiva (FOLFOXIRI più bevacizumab), mentre nei pazienti *unfit* per trattamenti di combinazione è possibile optare per la monochemioterapia con fluoropirimidine in associazione, quando possibile, al bevacizumab. L'efficacia e il tollerabile profilo di tossicità del bevacizumab sono stati, quindi, ampiamente dimostrati in associazione a tutte le possibili combinazioni di chemioterapia di diversa intensità (dalla monoterapia alla tripletta), così come nella terapia di mantenimento. Meno robuste sono le evidenze a sostegno della possibilità di modulare l'intensità della chemioterapia in combinazione con gli anticorpi anti-EGFR. I dati disponibili riguardano, in particolar modo, la loro associazione con doppiette di chemioterapici (FOLFIRI e FOLFOX), mentre più di recente sono stati valutati in combinazione con regimi a tre farmaci, triplette, in studi precoci che ne hanno dimostrato un'attività promettente, con

qualche dubbio sul profilo di tollerabilità legato in particolare all'elevata incidenza di eventi avversi gastroenterici.

Cetuximab e panitumumab non possono essere somministrati a pazienti i cui tumori presentino mutazioni a carico di *RAS* e, anche i tumori *BRAF* mutati traggono minimo beneficio da questi farmaci. I pazienti con mCRC *RAS* e *BRAF* wild type sono, quindi, i migliori candidati a questo trattamento, sebbene sviluppino poi invariabilmente meccanismi di resistenza acquisita.

Nel tentativo di spiegare i meccanismi alla base dello sviluppo di questo tipo di resistenza è stata formulata l'ipotesi per cui, in seguito al blocco della via di trasduzione del segnale mediata da EGFR, se ne potenzino di alternative, una tra tutte quella che coinvolge VEGF. Ciò costituisce il razionale biologico dell'esposizione sequenziale del paziente ad anticorpi anti-EGFR e anti-VEGF.

Tutte le prove soprariportate suggeriscono, quindi, che una strategia innovativa e promettente nel trattamento di pazienti affetti da mCRC molecolarmente selezionati potrebbe essere l'espone subito agli agenti più attivi (cioè la combinazione tripletta di FOLFOXIRI più cetuximab), con lo scopo di ottenere un rapido controllo della malattia e la massima riduzione volumetrica tumorale e, successivamente, utilizzare una terapia di mantenimento meno aggressiva per inibire la ricrescita tumorale.

Lo studio randomizzato, non comparativo, di fase II MACBETH ha lo scopo di valutare l'attività e la sicurezza in prima linea di un regime modificato di FOLFOXIRI associato a cetuximab e, allo stesso tempo, del mantenimento con cetuximab o bevacizumab, in pazienti con mCRC non resecabile. Lo studio ha arruolato pazienti con età compresa tra 18 e 75 anni, non precedentemente trattati per la malattia metastatica, selezionati inizialmente in base allo stato wild-type di *KRAS* e, dopo un emendamento nell'ottobre 2013, allo stato wt sia di *RAS* che di *BRAF*.

I pazienti venivano randomizzati a ricevere fino a 8 cicli di mFOLFOXIRI + cetuximab, seguito da cetuximab (braccio A) o bevacizumab (braccio B) fino alla progressione. L'endpoint primario dello studio era la

Progression Free Rate a 10 mesi dalla randomizzazione (10months-PFR).

Tra l'ottobre 2011 e il febbraio 2015, è stato eseguito lo screening di 323 pazienti provenienti da 21 centri italiani. Dei 143 pazienti randomizzati, i 116 risultati *all RAS/BRAF wt* sono stati inclusi nell'*intention-to-treat* population modificata (mITT) (braccio A/B n=59/57). Nell'intera mITT si è registrata un'età mediana di 60 anni e ottime condizioni cliniche dei pazienti (ECOG PS 0) nell'89% dei casi. La diagnosi dello stadio IV era avvenuta in modo sincrono a quella di CRC nell'84% dei casi, mentre quasi la metà dei pazienti aveva secondarismi limitati al fegato (45%).

Ad un follow-up mediano di 25,5 mesi, la 10m-PFR è stata del 52% nel braccio A e del 41% nel braccio B (endpoint primario non raggiunto), con una PFS mediana di 11.2 e 9.3 mesi. Il tasso di risposte era del 76% (braccio A/B) nei 106 pazienti valutabili e del 70% (braccio A/B 68%/72%) nell'intera popolazione mITT; soltanto in 2 pazienti per ciascun braccio sperimentale la PD è stata la miglior risposta registrata alle rivalutazioni in corso di trattamento. Il tasso di resezione è stato del 38% complessivamente (braccio A/B 46%/30%) e del 65% (braccio A/B 71% /58%) nel sottogruppo con malattia soltanto epatica. Le principali tossicità di grado 3-4 durante la terapia di induzione sono state neutropenia (33%), a cui si associa solo un 3% di neutropenia febbrile, diarrea (19%), eruzione cutanea (18%) e stomatite (6%).

In conclusione, nessuno dei due bracci ha raggiunto l'endpoint primario. Tuttavia, la terapia di induzione di 4 mesi con mFOLFOXIRI e cetuximab risulta fattibile in un contesto multicentrico e dotata di un'attività rilevante, che si esprime in elevati tassi di risposta e di conversione alla chirurgia. Questo elemento potrebbe influenzare positivamente i risultati in termini di OS, attualmente ancora immaturi.

Capitolo 1. Il tumore del colon-retto (CRC)

1.1 Epidemiologia

Il cancro costituisce un enorme onere per la società nei Paesi più e meno economicamente sviluppati. In particolare, nel corso degli anni, sono quest'ultimi a risentire maggiormente del problema, rappresentando circa il 57% dei casi e il 65% delle morti per cancro in tutto il Mondo.¹ Sulla base delle stime Globocan, circa 14.1 milioni di nuovi casi di cancro e 8.2 milioni di decessi correlati si sono verificati nel 2012 in tutto il mondo. La probabilità di andare incontro alla diagnosi di una forma invasiva di cancro, durante l'intero arco della vita, è elevata e maggiore per gli uomini (43%) che per le donne (38%). Le ragioni di questa differenza non sono ben comprese, ma in qualche misura probabilmente riflettono differenze di esposizione ambientale, ormonale e a complesse interazioni tra queste. Per gli adulti di età inferiore a 50 anni, tuttavia, il rischio di cancro è maggiore nelle donne (5.4%) rispetto agli uomini (3.4%), a causa della maggiore presenza di tumori al seno, all'apparato genitale e alla tiroide nelle giovani donne.² L'insorgenza del cancro, inoltre, è complessivamente in aumento a causa dell'invecchiamento della popolazione, della maggior prevalenza di fattori di rischio quali fumo, sovrappeso, inattività fisica e del cambiamento dei modelli riproduttivi connessi all'urbanizzazione e allo sviluppo economico.

I tumori con maggior incidenza, nel Mondo, sono quelli del polmone, della mammella e del colon-retto. Valutando invece la mortalità, il cancro del polmone mantiene anche in questo caso il primato sia tra gli uomini che tra le donne, in cui ha superato il cancro al seno nei Paesi più sviluppati, mentre quest'ultimo rimane la prima causa di morte cancro-correlata nei Paesi meno sviluppati, nel sesso femminile. Le altre principali morti di questo tipo sono dovute soprattutto a neoplasie di colon-retto e prostata, nei Paesi più sviluppati, e di fegato, stomaco e cervice uterina in quelli meno sviluppati. Questa disparità riflette differenze regionali per quanto riguarda i fattori di rischio e la diversa disponibilità di metodiche diagnostiche e trattamenti.

Una parte consistente dei casi di cancro e dei conseguenti decessi potrebbero essere evitati attraverso l'applicazione di misure di prevenzione efficaci, come il controllo del fumo, la vaccinazione e l'uso di test di diagnosi precoce.¹

Il cancro del colon-retto rappresenta quindi il terzo tumore per incidenza negli uomini (746.000 casi, 10% del numero totale) e il secondo nelle donne (614.000 casi, 9.2% del numero totale) nel Mondo. Complessivamente esso determina il 9.7% di tutti i tumori (ad eccezione dei tumori della pelle non-melanoma) con 447.136 nuovi casi in Europa (secondo per frequenza, 13% del totale).³

Il rischio di sviluppare un CRC nella popolazione generale è di circa il 5% dei Paesi Occidentali. Ci sono ampie variabilità geografiche di incidenza del CRC nel Mondo: i tassi più alti si registrano in Australia e Nuova Zelanda, Europa e Nord America, mentre quelli più bassi in Africa e Centro-Sud America. Essi stanno rapidamente crescendo in aree storicamente a basso rischio, incluso la Spagna e una serie di altri Paesi dell'Asia dell'Est e dell'Europa dell'Est.⁴ Inoltre, studi provenienti da 5 diversi continenti indicano che l'incidenza del tumore del colon-retto è significativamente aumentata dagli anni 1983-1987 agli anni 1998-2002 in modo quasi confinato ai Paesi in crescita economica.⁵ In particolare, i tassi tra gli uomini in Repubblica Ceca e Giappone hanno già superato il picco di incidenza osservato negli Stati Uniti, in Canada e in Australia, dove invece i tassi si stanno riducendo o stabilizzando. Questa tendenza è probabilmente il risultato di cambiamenti in ambito alimentare, del maggior tasso di obesità e dell'aumentata prevalenza dell'abitudine al fumo in quei Paesi. Gli Stati Uniti rappresentano, invece, l'unico paese in cui si sta osservando una diminuzione significativa dei tassi di incidenza in entrambi i sessi, conseguenza della sempre maggior diffusione di sistemi di screening che permettono la diagnosi precoce e la rimozione di lesioni precancerose.⁴ L'incidenza del CRC oltre a variare in base al sesso, negli Stati Uniti, è tendenzialmente maggiore nella razza Nera rispetto alla Bianca.⁵

In Italia si è registrato un trend in aumento nell'incidenza della malattia negli ultimi decenni. Dai 16.000 casi del 1970 si è, infatti, passati ad oltre

37.000 nel 2004, cambiamento da riferire soprattutto al sensibile miglioramento dell'accuratezza e della sensibilità delle tecniche diagnostiche e all'aumento della percentuale della popolazione anziana, secondario ad una più ampia aspettativa di vita. Il CRC presenta, infatti, un'incidenza maggiore nelle fasce di popolazione di età più avanzata, con un'età mediana di insorgenza di circa 70 anni.⁶

Per quanto riguarda la localizzazione della malattia, in circa il 70% dei casi essa viene riscontrata nel tratto distale dell'intestino (9% nel colon discendente, 55% a livello di retto e sigma). Si registra però recentemente una tendenza ad uno shift della distribuzione verso i tratti prossimali del colon. Alla differente sede della neoplasia corrispondono sensibili differenze di tipo clinico nell'ambito della presentazione della malattia, ma anche di tipo prognostico e terapeutico.⁷

Parallelamente all'aumento del numero dei casi di CRC, si è assistito ad una riduzione della mortalità correlata, che risulta essere di 693.933 casi nel Mondo (quarta causa, 8.5% del totale) e di 214.866 casi in Europa (seconda causa, 12.2% del totale) nel 2012.³

Questo trend in riduzione si rileva in particolar modo in quei Paesi dell'Occidente che possono usufruire dei miglioramenti diagnostico-terapeutici e in cui è presente una maggior consapevolezza della malattia nella popolazione generale.⁴ La sopravvivenza a 5 anni negli uomini è aumentata dal 48.9% (1975-1977) al 66.1% (2003-2009) e nelle donne dal 50.6% al 65.7% negli stessi periodi.⁸ Essa dipende in gran parte dallo stadio della malattia al momento della diagnosi e varia, infatti, dal 90% per quelli iniziali, in cui la neoplasia è localizzata, al 10% negli stadi avanzati, metastatici.⁹ Il CRC rappresenta la sesta causa di morte cancro-correlata nell'uomo e la quarta nelle donne, con i tassi stimati più elevati, in entrambi i sessi, nell'Europa centro orientale.

La prevalenza a 5 anni (considerando coloro che sono ancora vivi dopo 5 anni dalla diagnosi) nel 2012 supera i 3.5 milioni nel Mondo e gli 1.2 milioni in Europa.³

1.2 Eziologia e fattori di rischio

1.2.1 Fattori ambientali

Lo sviluppo economico e l'adozione di uno stile di vita "occidentale" sono stati messi in correlazione con l'aumentata incidenza di CRC. Allo stesso tempo, studi sulla migrazione di popolazioni hanno dimostrato come gli immigrati in aree ad alta incidenza, come i Paesi industrializzati, si ammalino molto più frequentemente rispetto al resto della popolazione di origine, rimasta in aree a bassa incidenza.¹⁰

Sembrerebbe quindi evidente il ruolo dei fattori ambientali nella cancerogenesi coloretale. Numerose indagini hanno confermato l'importanza in quest'ambito di fattori quali l'alimentazione, il fumo di sigaretta, l'obesità e la sedentarietà.

La dieta sembra essere correlata con la patogenesi del CRC in vario modo.

Molteplici meccanismi potrebbero, infatti, spiegare l'associazione tra il CRC e l'assunzione di carni rosse, soprattutto se trasformate attraverso processi di salatura, affumicatura o fermentazione. È stato innanzitutto individuato il potenziale effetto mutageno delle amine eterocicliche, contenute nella carne cotta ad alte temperature, e degli N-nitroso composti, formati, in seguito alla sua ingestione, nel tratto gastrointestinale. La sintesi di queste sostanze dannose avviene nello stomaco attraverso una reazione che risulta essere potenziata dalla cottura e catalizzata dall'elevata presenza di eme nelle carni rosse, rispetto alle altre carni fresche e al pesce. Il gruppo eme stimola la formazione di radicali liberi che danneggiano il DNA e alterano la normale proliferazione dell'epitelio intestinale. I radicali liberi dell'ossigeno vengono normalmente contrastati da meccanismi endogeni, che possono essere incentivati e potenziati da una dieta ricca di frutta e verdura contenente antiossidanti, ma questo può non essere sufficiente a proteggere il colon dal danno al DNA.¹⁰⁻¹¹ L'aggiunta di nitriti e nitrati esogeni per la preservazione delle carni può ulteriormente aumentare l'esposizione alle nitrosamine, N-nitroso composti e loro precursori.¹⁰

L'elevata assunzione di alcuni tipi di acidi grassi e di colesterolo aumenta la sintesi degli acidi biliari che, a loro volta, possono essere convertiti in

sostanze potenzialmente cancerogene da parte dei batteri intestinali. Altri, come gli acidi grassi polinsaturi omega-3 o quelli monoinsaturi, sembrerebbero invece esercitare un effetto protettivo sull'epitelio intestinale, mediato dalla regolazione della sintesi delle prostaglandine, di processi immuno-modulatori, dell'attività dell'oncogene *RAS* e della proteina C kinasi. Tutto ciò porterebbe alla riduzione della proliferazione cellulare e dell'angiogenesi e, allo stesso tempo, all'aumento dell'apoptosi e della differenziazione cellulare.¹²

L'associazione tra l'assunzione dietetica di fibre e la neoplasia coloretale è stata studiata in modo intensivo fin dal 1970, quando Burkitt formulò l'ipotesi di un ruolo protettivo delle stesse, basata sull'osservazione della ridotta incidenza della neoplasia nelle popolazioni africane rurali, la cui dieta era ad elevato contenuto di fibre.¹³

Da allora i risultati dei vari studi sono stati spesso contrastanti. Una recente metanalisi¹⁴ dimostra la riduzione del rischio di CRC del 10% all'aumento dell'assunzione di fibre di 10 g/die. Nella maggior parte dei casi si evidenzia, inoltre, un'associazione inversamente proporzionale tra l'assunzione alimentare di fibre e il rischio di adenomi coloretali, precursori del CRC. Le fibre provenienti da frutta, verdura e cereali aumentano la massa fecale, riducono il tempo di transito nel colon, diluiscono o assorbono i cancerogeni fecali, riducono il PH intraluminale e favoriscono la produzione di acidi grassi a catena corta tramite fermentazione batterica; tutto ciò sembra determinare un effetto protettivo. Frutta e verdura sono inoltre ricche di antiossidanti e micronutrienti, come vitamina C, tocoferolo, carotenoidi, glucosinolati (precursori degli istiocinati) e folati, ovvero elementi essenziali per la sintesi, la riparazione e la metilazione del DNA, a lungo studiati come possibili agenti chemoprotettivi.¹⁵⁻¹⁶

Diversi sembrano i risultati riguardo al tumore esclusivamente rettale, probabilmente a causa anche dei diversi profili molecolari associati.¹⁵

I carboidrati raffinati sembrano anch'essi correlati alla cancerogenesi coloretale, soprattutto quelli a "high glycemic index", che determinano un'elevata risposta glicemica e di conseguenza un maggior incremento di insulina nel sangue in seguito al pasto. Confrontando gli effetti

determinati da alimenti diversi, è stato messo in luce come il pane, che ha un indice glicemico maggiore, sia più fortemente correlato al rischio di sviluppare CRC rispetto alla pasta.¹⁷

Il consumo di alcol è uno dei più importanti fattori di rischio neoplastici noti e anche, potenzialmente, uno dei più evitabili. Oltre al tumore di cavità orale, faringe, laringe, esofago, fegato e mammella esso è correlato anche a quello del colon-retto. Sono numerose le metanalisi che supportano una positiva associazione tra il consumo di bevande alcoliche e il rischio di sviluppare il CRC. Una di esse riporta un aumentato rischio relativo del 21% in coloro che assumono alcol moderatamente (12.6-49.9 g/die di etanolo) e del 52% in chi lo fa in modo più importante (più di 50 g/die), rispetto a chi non beve, ai bevitori occasionali o a coloro che assumono fino a 12.5 g/die di alcol, l'equivalente di un drink. Complessivamente, quindi, ogni 10 g/die di alcol assunto determina un aumento statistico del 7% nel rischio di andare incontro a CRC, un'associazione quindi molto forte.¹⁸

L'attività fisica è un altro dei fattori correlati alla cancerogenesi coloretale dal momento che si è dimostrato come ad un suo aumento corrisponda una riduzione del rischio. Essa sembra, inoltre, ridurre anche il tasso di evoluzione maligna di polipi adenomatosi⁸ e la mortalità cancro-correlata.¹⁹

Tra i disturbi correlati all'obesità è stata accertata la presenza del CRC. Numerose reviews e metanalisi indicano come il rischio ad essa associato (intesa come BMI maggiore o uguale a 30 kg/m²) sia maggiore per il cancro al colon rispetto a quello al retto e nell'uomo rispetto alla donna.²⁰ Nella valutazione dell'eccesso di peso è importante individuarne la distribuzione corporea. Il tessuto adiposo di tipo viscerale, indicato dalla misura in cm della circonferenza della vita, sembra essere più attivo dal punto di vista metabolico e nella secrezione di ormoni e citochine rispetto a quello sottocutaneo e, quindi, maggiormente correlato al rischio neoplastico. Al momento i valori di cut-off per la circonferenza della vita, in relazione all'aumentato rischio di morbilità, sono 102 cm nell'uomo e 88 cm nella donna. Il peso corporeo e il BMI sembrano quindi non essere parametri accurati nel quantificare il rischio di CRC,

soprattutto nelle donne. Sembrerebbe proprio l'obesità una delle cause principali della maggior incidenza di CRC dei Paesi industrializzati.²¹ I meccanismi tramite i quali essa agisce, complessivamente, favoriscono la crescita tumorale, la migrazione cellulare e la formazione di metastasi, determinando anche una prognosi peggiore rispetto ai pazienti normopeso. Si riscontrano, infatti, l'insulino-resistenza, l'iperinsulinemia, l'iperglicemia persistente, lo stato di flogosi cronica, lo stress ossidativo, l'alterazione della risposta immunitaria, la produzione di adipochine e l'aumento dell'IGF-1. Fondamentali in questo ambito sono, inoltre, sia l'intera sindrome metabolica correlata all'obesità, sia gli elevati livelli di estradiolo endogeno.²⁰ Si stima che in Europa il 10.9% dei tumori al colon negli uomini e il 2.6% nelle donne siano correlati all'eccesso di BMI (maggiore o uguale a 25 kg/m²) e, considerando che l'obesità generale espressa dal BMI non è così rappresentativa del rischio, probabilmente queste percentuali sono sottostimate.²¹

Una maggior incidenza, sia di adenomi sia di CRC, e un'aumentata mortalità cancro-correlata sono proprie dei soggetti fumatori, secondo una relazione dose-correlata: oltre i 20 packs/year aumenta soprattutto il rischio di insorgenza di polipi adenomatosi, mentre oltre i 30 packs/year aumenta direttamente anche il rischio di carcinoma.²²⁻²³

I tumori gastrointestinali ed extraintestinali, come melanoma, tumori cutanei non-melanoma e linfoma, rappresentano complicanze tardive note delle malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD). La loro comparsa è correlata alla flogosi cronica che caratterizza questi quadri patologici e ai corrispondenti elevati livelli di citochine e chemochine proinfiammatorie quali IL-1, IFN-gamma e TNF-alfa.²⁴

Nello specifico, per quanto riguarda il rischio di CRC, esso aumenta in relazione alla durata della malattia, alla sua estensione, ad un'eventuale familiarità per CRC, ad una coesistente colangite sclerosante primaria e al grado di infiammazione presente. I complessi meccanismi coinvolti comprendono la produzione continua ed eccessiva di mediatori dell'infiammazione, lo stress ossidativo e il ruolo della flora batterica intestinale, oltre a fattori genetici come alterazioni epigenetiche e l'instabilità cromosomica e dei microsatelliti.

Tale sarebbe l'importanza dell'infiammazione che è stato ipotizzato un ruolo chemiopreventivo dell'acido acetilsalicilico e di altri immunomodulatori, oltre che dell'acido ursodesossicolico, dei FANS, dei folati ed eventualmente delle statine.

I due fattori maggiormente riconosciuti determinare un rischio evolutivo canceroso nelle IBD sono la durata della malattia e la sua estensione. Due ampie metanalisi evidenziano un aumento del rischio di sviluppare il CRC dall'1.6% a 10 anni al 18.4% a 30 anni per la rettocolite ulcerosa e dal 2.9% a 10 anni all'8.3% a 30 anni nel morbo di Crohn, con una prevalenza complessiva del 3.7% che sale al 5.4% nelle forme estese.²⁵

1.2.2 Fattori genetici

Nelle varie fasi dello sviluppo e della progressione del CRC, parallelamente alla componente ambientale, opera anche una componente genetica, come chiaramente dimostrato dall'aumentato rischio che si correla alla familiarità per neoplasia e ad alcune sindromi ereditarie. Fattori genetici possono influenzare la cancerogenesi tanto nelle forme familiari che in quelle sporadiche. I soggetti con familiarità possono sviluppare CRC conseguentemente ad alterazioni genetiche ad alta, media o bassa penetranza. L'aumentato rischio di neoplasia in queste persone sembrerebbe in parte spiegato dalla presenza di numerose varianti geniche a basso rischio che, singolarmente, non hanno un ruolo significativo. Nonostante la grande disponibilità di tecniche per la loro identificazione, in una considerevole quota di queste forme, non si riesce ad individuare una mutazione specifica.

Le forme familiari di CRC si definiscono se presenti almeno due parenti di primo grado con CRC. Esse rappresentano circa il 20% dei casi totali, dato che risulta ampiamente sottostimato se si considera tutti quei casi che potrebbero essere spiegati da fattori ereditari (35%). Ovviamente, ai diversi profili genetici si somma il ruolo dato dall'esposizione ai diversi fattori ambientali, da cui deriva la variabilità inter-individuale della suscettibilità genetica nello sviluppo dei tumori del colon-retto.

L'importante ruolo della storia familiare si riflette anche nella pratica clinica, dovendo questi soggetti eseguire uno screening precoce e più intensivo rispetto al resto della popolazione.

Una mutazione ad alta penetranza a carico di specifici geni, ben identificati e studiati, determina invece delle vere e proprie sindromi familiari ad elevato rischio di CRC. Queste forme rappresentano soltanto il 2-6% dei casi. Tra le forme non correlate alla presenza di polipi la più frequente, responsabile del 2-3% di tutti i CRC, è la Sindrome di Lynch (LS o HNPCC, Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer), causata da alterazioni a carico dei geni del mismatch repair (MMR genes: MLH1 nel 90%, MSH2 nel 7%, MSH6 nel 10% o PMS2 nel 5%, con recente scoperta anche di EPCAM/TACSTD1). L'insieme delle alterazioni genetiche in questa malattia va a configurare un fenotipo di instabilità dei microsatelliti (MSI), dimostrato all'immunoistochimica tramite il riscontro di una ridotta espressione delle corrispondenti proteine del mismatch repair, capaci di riparare errori di appaiamento di basi formati durante la replicazione del DNA. I microsatelliti sono sequenze del DNA formate dalla ripetizione fino a 50.000-100.000 volte di mono-, di-, tri- o tetra-nucleotidi, uniformemente distribuite nel genoma.²⁶⁻²⁷ Si distinguono due forme di Sindrome di Lynch: nella prima (tipo I) l'aumentato rischio di neoplasie si ripercuote soltanto a livello coloretale, con prevalente localizzazione a livello prossimale e frequente riscontro di numerosi tumori primitivi concomitanti a livello colico, mentre nella forma di tipo II si sviluppano più frequentemente neoplasie extracoliche, tra cui il carcinoma dell'endometrio, tumori del tratto urinario e del sistema biliare.²⁸

Tra le forme caratterizzate dalla presenza di polipi troviamo principalmente la Poliposi Adenomatosa Familiare (FAP) e le sue varianti (FAP attenuata, Sindrome di Turcot, Sindrome di Gardner). La FAP è una patologia a trasmissione autosomica dominante causata dalla mutazione del gene APC (Adenomatous Polyposis Coli) a cui segue un'iper-stimolazione della proliferazione cellulare. Questa alterazione genica è stimata essere "de novo" nel 15-20% dei casi, in cui va quindi a determinare forme sporadiche di malattia. Se ne riconosce una forma

classica, caratterizzata dallo sviluppo di centinaia o migliaia di polipi adenomatosi coloretali (almeno 100), soprattutto tubulari, dopo la prima decade di vita, e una forma attenuata (AFAP), correlata a specifiche mutazioni di APC, in cui il numero di polipi è ridotto (inferiore a 100)²⁹. La FAP è responsabile dello 0.2-1% dei CRC, infatti, anche in questo caso, i soggetti affetti presentano un maggior rischio di sviluppare altre lesioni sia di tipo neoplastico, quali l'adenocarcinoma gastrico e quello duodenale (seconda causa di morte dei pazienti con FAP dopo il CRC), tumori desmoidi, neoplasie a carico di fegato, vie biliari, pancreas ed encefalo, sia di altro tipo quali macchie da iperpigmentazione retinica, osteomi a livello del cranio, della mandibola e delle ossa lunghe, oltre a varie alterazioni dentarie.^{26-27,30} Nel caso prevalgano queste manifestazioni extracoliche si possono individuare la Sindrome di Gardner³¹ o la Sindrome di Turcot³². In particolare, nella prima si riscontrano molto spesso gli osteomi, mentre nella seconda è frequente il medulloblastoma. I soggetti con FAP, se non trattati, sviluppano CRC, spesso multipli, praticamente nel 100% dei casi già in giovane età, con picco di incidenza tra la terza e la quarta decade³³, a differenza della AFAP in cui l'evoluzione maligna avviene solo nel 50% dei casi e ad età più avanzate (50-60 anni).³⁴

Tra le forme ereditarie meno comuni devono essere annoverate la Sindrome di Peutz-Jeghers e la Poliposi Giovanile. La prima ha una trasmissione autosomica dominante ed è correlata alla mutazione a carico del gene STK11 (meglio conosciuto come LKB1), che codifica per una serina-treonina chinasi. Clinicamente essa determina un'iperpigmentazione muco-cutanea, ma soprattutto la comparsa di polipi amartomatosi gastrointestinali, in particolar modo nel colon e nel piccolo intestino, ma anche di polipi adenomatosi colici e iperplastici gastrici. È inoltre presente una spiccata predisposizione allo sviluppo di neoplasie a carico di duodeno, colon, mammella, pancreas, stomaco, piccolo intestino, cervice, utero, ovaio, testicolo e tiroide.^{26,35} Nella Poliposi Giovanile si riscontrano solitamente molteplici polipi amartomatosi del colon-retto in età giovanile, associati ad un rischio aumentato di sviluppare il CRC. Mutazioni a carico di SMAD4 o BMPR1A

sono state individuate in circa il 40% dei soggetti affetti. Queste, e altre a livello di PTEN e ENG, alterano la via di trasduzione del segnale che coinvolge TGF-beta, un importante modulatore di molteplici processi cellulari. Mutazioni a carico di PTEN determinano, inoltre, specifiche sindromi caratterizzate da macrocefalia e ritardo nello sviluppo (diagnosticati in bambini di due anni) o da una storia di multiple neoplasie primarie (riportate in pazienti di 60 anni) a carico di mammella, tiroide, endometrio, rene, colon e cute.

A questi quadri se ne associano ancora altri la cui eziologia genetica rimane sconosciuta, nonostante i progressi nelle tecnologie di genotipizzazione e sequenziamento del DNA: poliposi "serrata" (o "poliposi iperplastica") e il CRC ereditario non poliposico non associato a difetti del mismatch repair (o "CRC familiare type X"). Quest'ultimo, confrontato con la Sindrome di Lynch, determina un minor rischio di tumore sia colico che extracolico e si presenta solitamente ad età più avanzate. Nella poliposi serrata il rischio di CRC è, invece, molto alto e varia dal 25 al 70%, con riscontro spesso già alla diagnosi.²⁶

1.3 Screening

Con il termine “screening” si intende la valutazione sistematica di una popolazione generale mediante esami clinici, radiologici e laboratoristici atti a riconoscere precocemente la presenza di una patologia in un soggetto ancora asintomatico. L'obiettivo principale è quello di ridurre la mortalità della popolazione esaminata. Lo screening rappresenta una metodica di prevenzione secondaria e si applica molto bene al tumore del colon-retto. Ad essa si possono associare accorgimenti di prevenzione sia primaria, che mira invece a ridurre l'incidenza dello sviluppo della patologia nei soggetti sani, eliminando o riducendo la loro esposizione a fattori di rischio che possano promuoverla, sia terziaria. Quest'ultima consiste nella prevenzione e nell'adeguata cura delle complicanze e delle recidive di malattia. Infine, la chemioprevenzione si prefigge di ridurre l'incidenza delle neoplasie attraverso l'utilizzo di farmaci, sostanze biologiche o elementi nutritivi potenzialmente in grado di inibire, ritardare o invertire il processo di cancerogenesi in qualunque momento, prima della fase invasiva di malattia.³⁶ Riguardo quest'ultimo aspetto, sempre maggior interesse suscita il ruolo dell'aspirina (acido acetilsalicilico) e di altre molecole quali gli anti-infiammatori non steroidei (FANS). Il meccanismo con cui l'acido acetilsalicilico andrebbe a ridurre il rischio di CRC e di svariati altri tumori è l'inibizione della COX-2 (ciclossigenasi, isoforma 2) oltre che l'induzione dell'apoptosi cellulare e dell'up-regulation di geni oncosoppressori. La COX-2 è un enzima responsabile della sintesi delle prostaglandine, molecole frequentemente espresse in modo anomalo ed eccessivo nelle neoplasie, dove sembrano implicate in processi di cancerogenesi, crescita tumorale, apoptosi e angiogenesi. Inizialmente, a favore del ruolo protettivo dell'aspirina nei confronti del CRC, erano disponibili soltanto dati provenienti da studi che ne prevedevano la somministrazione giornaliera di dosi elevate (≥ 500 mg/die), associata quindi ad elevato rischio di sanguinamento che ne limitava l'utilizzo.³⁷ Successivamente ne è stato però confermato il ruolo a lungo termine (20 anni di follow up) anche a dosi minori (75 mg/die), sia in termini di incidenza che di mortalità, con

un maggior impatto a livello dei distretti prossimali del colon.³⁸ Un'ulteriore metanalisi di 30 studi, comprendente circa 37.500 pazienti, ha evidenziato che l'uso regolare di aspirina è correlato alla riduzione del rischio di insorgenza di molte neoplasie a carico del distretto gastrointestinale, tra cui il CRC (RR=0.73; 95% CI 0.67-0.79), ma anche a livello di mammella e prostata.³⁹

Il ruolo di alcuni FANS è stato chiaramente dimostrato in sottopopolazioni a rischio quali i pazienti con HNPCC, in cui la somministrazione di sudilac ha dimostrato una significativa riduzione del numero e della dimensione dei polipi e in cui è stato più volte ribadito anche il ruolo dell'aspirina, o quelli con FAP, in cui un analogo risultato positivo è stato ottenuto tramite l'utilizzo di celecoxib, inibitore selettivo di COX-2.⁴⁰⁻⁴¹ Altri studi sulla chemioprevenzione del CRC hanno dimostrato una possibile riduzione del rischio di comparsa di adenomi, diretti precursori della forma neoplastica, in associazione all'assunzione di carbonato di calcio. Questa correlazione è spiegata dal fatto che il calcio può legare derivati biliari e acidi grassi all'interno del lume intestinale, andando così ad inibire la proliferazione cellulare.⁴⁰

Occupandoci del vero e proprio screening del CRC, l'indagine su popolazione asintomatica trova giustificazione nella notevole diffusione di questa neoplasia, nell'elevata mortalità e morbilità correlate, nella disponibilità di test di screening validi, attuabili su larga scala, accettabili e facili da eseguire, accurati, abbastanza specifici e sensibili. A questi elementi si aggiunge la particolare storia evolutiva che caratterizza il tumore coloretale il quale si sviluppa, attraverso una lunga fase preclinica, a partire da lesioni precancerose (polipi adenomatosi) che possono essere individuate e rimosse tramite un intervento terapeutico più probabilmente curativo se diagnosticate precocemente.

Le metodiche di screening in questo ambito comprendono sia quei test il cui scopo è, fondamentalmente, quello di individuare lesioni polipoidi sanguinanti, spesso già neoplastiche, sia quelli che invece cercano di individuare lesioni e polipi pre-neoplastici, non ancora sanguinanti. I primi sono rappresentati dalla ricerca di sangue occulto nelle feci (RSO)

attraverso il test al guaiaco o Hemoccult (gFOBTs: guaiac Fecal Occult Blood Testing) e i test immunochimici fecali (FITs: Fecal Immunochemical Tests), oltre che dalla ricerca di DNA nelle feci e dal dosaggio della porfirina fecale (Hemoquant). Al secondo gruppo di indagini appartengono, invece, numerose metodiche endoscopiche e radiologiche di studio del colon tra cui la colonscopia, la colonscopia virtuale (TC-colonografia) e il clisma opaco a doppio contrasto.⁴²

I test di RSO necessitano del fondamentale presupposto rappresentato dal fatto che i tumori del colon-retto sanguinino e che questo sangue possa essere identificato nelle feci. Gli approcci possibili, come già riportato, sono due: gFOBT e FIT. Il gFOBT consiste nel prelievo di due campioni di feci ad ogni evacuazione, per tre volte consecutive, al fine di aumentare la sensibilità del test che potrebbe risentire del sanguinamento intermittente da parte della neoplasia.⁴³ In questi campioni viene ricercata l'attività della perossidasi, enzima presente nella molecola di emoglobina. Il test risulta, però, aspecifico nell'individuare l'emoglobina umana e può rilevare altre fonti di perossidasi, oltre che positivizzarsi in presenza di emoglobina animale di origine alimentare, tanto che sono raccomandati tre o più giorni di restrizione alimentare in tal senso per limitare i falsi positivi.⁴⁴ La sua sensibilità varia dal 25 al 38% per il CRC e dal 16 al 31% per gli adenomi, raggiungendo il 67% per perdite ematiche di 10 ml/die e l'80-90% per perdite superiori a 20 ml/die. Quest'ultima rappresenta, quindi, il limite principale della metodica, a cui si aggiunge la già citata aspecificità e una variabilità inter-individuale nella lettura del risultato. Allo stesso modo essa è economica, molto diffusa, facilmente disponibile e stabile alle diverse temperature, per cui viene adottata nella maggior parte dei casi anche in Italia nella popolazione asintomatica a rischio generico dopo i 50 anni, da eseguire ogni 12-24 mesi.⁴⁵ Il FIT utilizza, invece, anticorpi che riconoscono in modo specifico l'emoglobina umana, per cui non necessita di restrizione alimentare nei giorni precedenti la raccolta dei campioni, di cui ne sono sufficienti soltanto 1 o 2 per l'analisi. Se ne distingue una tipologia di analisi qualitativa, che fornisce una

risposta binaria (positiva o negativa), e una quantitativa, da cui otteniamo una concentrazione di emoglobina nelle feci espressa in ng/ml.⁴⁵

Confrontato con il gFOBT risulta avere una sensibilità maggiore sia per CRC (61-91%) sia per gli adenomi (27-67%), ma essere anch'esso aspecifico. Complessivamente i dati a disposizione sono difficilmente interpretabili, se consideriamo il numero enormemente inferiore di pazienti sottoposti a FIT rispetto al gFOBT.⁴⁶

L'Hemoquant consente una misura quantitativa dell'emoglobina fecale e quindi il suo dosaggio, sfruttando la reazione chimica in cui il gruppo eme dell'emoglobina intatta viene convertito in protoporfirina ad opera di sostanze quali acido ossalico, ossalato ferroso o solfato ferroso. I due campioni di feci, prima e dopo la conversione enzimatica, vengono sottoposti a fluorescenza comparativa rispetto ad uno standard di riferimento. Nonostante il valore aggiunto dato dalla quantificazione del dato, il limite principale, che rende questo test poco utilizzabile, è la bassa specificità dovuta alla rilevazione di altre sostanze quali ad esempio mioglobina, catalasi e numerose porfirine.⁴⁷

Per quanto riguarda la ricerca di DNA fecale: il test PreGen-Plus consiste nell'estrazione del DNA umano da cellule di esfoliazione della mucosa del colon. La problematica della bassa sensibilità degli altri test di ricerca del sangue occulto nelle feci, correlata al fatto che il sanguinamento delle lesioni è solitamente intermittente soprattutto nelle fasi precoci di malattia, viene quindi risolta dal fatto che queste cellule si possono riscontrare nelle feci in modo pressoché continuo. Sul DNA estratto vengono ricercate specifiche alterazioni e mutazioni a carico di geni (23 al momento) che possono essere associate al cancro, tra cui 21 specifiche alterazioni puntiformi nei geni APC, KRAS e p53, e quelle a carico del gene BAT26, coinvolto nella instabilità microsatellitare (MSI). La ricerca del DNA fecale consente quindi di individuare i soggetti realmente a maggior rischio, così da indirizzarli correttamente ad uno screening più approfondito, mediante esami quali la colonscopia, che viene invece limitata nei soggetti a rischio minore. Dati i costi eccessivi del kit, l'utilizzo attuale sull'intera popolazione non è comunque possibile.⁴⁸⁻⁴⁹ Studi di fase III hanno dimostrato che complessivamente la

RSO riduce la mortalità per CRC di circa il 10-20%.⁵⁰⁻⁵³ Tale beneficio è stato stimato al 16% in una revisione di Cochrane, che illustra anche le diverse metodologie di studio e i possibili bias dei quattro trials di fase III sopra citati.⁴³

Una positività alla ricerca del sangue occulto nelle feci dovrebbe costituire l'indicazione ad esami più approfonditi, quali la pancoloscopia. Essa costituisce allo stesso tempo sia una metodica diagnostica, grazie alla possibilità di ispezionare l'intera mucosa colica e di eseguire biopsie, estremamente sensibile (sensibilità da 78.5% per piccoli adenomi inferiori a 0.5 cm a 96.7% per grossi polipi o carcinomi) e specifica (98%), sia una tecnica terapeutica, permettendo la rimozione di polipi sospetti, che verranno successivamente sottoposti ad esame istologico.⁵⁴

Per queste sue caratteristiche è stato attribuito a questo esame endoscopico il ruolo di "test ideale", sia per la prevenzione, sia per la diagnosi precoce del CRC. Note negative si rilevano nella sua invasività, nella variabilità inter-operatore della sua esecuzione, nel rischio di complicanze (sanguinamento, perforazione), oltre che nella necessità di una rigida preparazione orale. Nonostante la colonscopia virtuale (mediante TC o RM) risolva parte di questi limiti di accettabilità e invasività della pancoloscopia, ogni esame risultato positivo deve essere seguito da quest'ultima come conferma diagnostica e come tecnica interventistica. Permangono comunque l'operatore-dipendenza, la necessità di una, seppur minore, preparazione intestinale e gli elevati costi, a cui si aggiunge una limitata disponibilità, ridotta specificità e la distensione gassosa tramite insufflazione o l'infusione di mezzo di contrasto necessarie durante la procedura.⁵⁴

L'intensità della sorveglianza necessaria varia in base alla categoria di rischio, per cui è fondamentale l'individuazione di sottopopolazioni con caratteristiche diverse.

Il percorso di screening per la popolazione generale a rischio standard dall'età di 50 anni comprende la ricerca del sangue occulto nelle feci (RSO) ogni 12-24 mesi o sigmoidoscopia ogni 5 anni o colonscopia ogni 10 anni. Se l'RSO è positivo, è obbligatoria la colonscopia.⁵⁵

Le linee guida AIOM (Associazione Italiana di Oncologia Medica) 2014⁵⁶ indicano:

- in caso di 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) di eseguire la colonscopia ogni 5 anni dai 40 anni, o da 10 anni prima dell'età del familiare più giovane con diagnosi di CRC.
- in caso di diagnosi di carcinoma del colon-retto o polipi adenomatosi in un familiare di primo grado di età >60 anni o in almeno 2 parenti di secondo grado di qualsiasi età di iniziare il percorso standard di screening a 40 anni.
- in pazienti con Polipomatosi Adenomatosa familiare (FAP) di eseguire la colonscopia ogni 1-2 anni, il test genetico e la sigmoidoscopia (annuale) volta a individuare i segni della FAP dai 10-12 anni.
- in pazienti con Sindrome di Lynch (HNPCC) di eseguire la colonscopia ogni 1-2 anni e il test genetico da 20-25 anni o da 10 anni prima dell'età del familiare più giovane con diagnosi di carcinoma del colon-retto.
- in caso di Malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD) di eseguire la colonscopia ogni 1-2 anni dopo circa 8-12 anni dalla comparsa dei sintomi di colite.

1.4 Cenni di Anatomia Patologica

I carcinomi coloretali iniziano come lesioni in situ ed evolvono con modalità morfologiche diverse dal punto di vista macroscopico.⁵⁷

In base alla classificazione macroscopica secondo Bormann distinguiamo:

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

I tumori del colon-retto prossimale tendono ad accrescersi come masse polipoidi esofitiche che si estendono lungo le pareti del cieco e del colon ascendente, arrivando solo raramente a determinare un'occlusione, vista la relativa ampiezza del viscere. Quelli del colon distale tendono, invece, ad interessare l'intera circonferenza dell'intestino e a determinare un'intensa reazione desmoplastica stromale, assumendo una forma anulare che simula una stenosi.⁵⁷

Dal punto di vista microscopico si riconoscono, secondo la classificazione istologica elaborata dalla World Health Organization:⁵⁸

- adenocarcinoma, costituito da strutture villose e/o tubulari di epitelio ghiandolare e altri possibili foci di tipi mucoso o squamoso;
- adenocarcinoma mucoide (o mucinoso), caratterizzato dalla presenza di muco extracellulare spesso visibile macroscopicamente, che costituisce più del 50% del volume tumorale;
- carcinoma a cellule ad anello con castone (signet-ring cell carcinoma), costituito per più del 50% da cellule maligne isolate contenenti mucina intracitoplasmatica, a costituire un vacuolo che disloca il nucleo in periferia;

- carcinoma squamoso, rara forma costituita esclusivamente da cellule squamose, con ponti intercellulari e cheratina;
- carcinoma adenosquamoso, in cui sono contemporaneamente presenti aree di tipo ghiandolare e di tipo squamoso;
- carcinoma a piccole cellule (oat cells), con cellule simili in istologia, comportamento e istochimica a quelle del carcinoma a piccole cellule polmonare;
- carcinoma indifferenziato, che non ha una struttura ghiandolare o altre caratteristiche che indichino una differenziazione definita ed è privo di aspetti morfologici di differenziazione epiteliale;
- carcinoma midollare, prevalentemente costituito da lamine e trabecole solide di cellule, in genere regolari e con modeste atipie nucleari, e caratterizzato dalla presenza di numerosi linfociti intraepiteliali;

Nonostante le notevoli differenze macroscopiche, i tumori del colon destro e di quello sinistro hanno caratteristiche microscopiche simili.

Gli adenocarcinomi rappresentano oltre l'85% di tutte le neoplasie coloretali. Vi si ritrovano, a seconda del grado di differenziazione, da cellule cilindriche simili alla controparte adenomatosa, che tuttavia invadono la sottomucosa e la tonaca muscolare propria, a masse anaplastiche indifferenziate. La quota restante è costituita dagli adenocarcinomi mucinosi (10%) e dagli altri istotipi (nel complesso meno del 5%). I carcinomi squamosi e adenosquamosi sono molto rari.

La differenziazione cellulare può essere definita in base alla presenza o all'assenza di determinati parametri, quali la conservazione della polarità del nucleo, la presenza e configurazione delle strutture ghiandolari, il pattern di crescita, l'infiltrazione infiammatoria e la reazione desmoplastica. Si identificano così quattro gradi di differenziazione cellulare (grading):⁵⁷

- grado 1 (G1): neoplasie ben differenziate, caratterizzate da cellule cilindriche simili alla loro controparte adenomatosa, che invadono la sottomucosa e la tonaca muscolare propria;

- grado 2 (G2): neoplasie moderatamente differenziate;
- grado 3 (G3): neoplasie scarsamente differenziate;
- grado 4 (G4): neoplasie anaplastiche del tutto prive di strutture ghiandolari.

Nella caratterizzazione dei CRC vengono valutati altri parametri istologici, soprattutto in funzione di una loro correlazione con le scelte terapeutiche: l'invasione linfovaskolare e perineurale, il tipo di crescita (espansiva o infiltrativa), il grado di infiltrazione linfocitaria al margine di invasione, la presenza di aggregati nodulari linfocitari peritumorali (reazione linfocitaria "tipo Crohn"), il numero di linfociti compenetranti le cellule neoplastiche (tumor infiltrating lymphocytes, TIL).⁵⁹

Indipendentemente dall'evento iniziante, vi è una ben definita concatenazione di alterazioni genetiche che conduce all'insorgenza dei carcinomi coloretali. Il modello proposto da Fearon e Volgestein è stato ormai ampiamente accettato e prevede come sequenza-tipo, nello sviluppo della neoplasia, la sequenza adenoma-carcinoma. È facile comprendere come i programmi di follow-up di identificazione degli adenomi ed escissione delle lesioni sospette, riducano l'incidenza e la mortalità del carcinoma coloretale.⁶⁰

Gli adenomi coloretali (polipi adenomatosi) sono definiti quindi "polipi neoplastici", dato il rischio di trasformazione che li caratterizza, distinguendosi da quelli "non neoplastici" (iperplastici, infiammatori, amartomatosi e linfoidi) che di per sé non hanno un potenziale maligno. Gli adenomi sono neoplasie intraepiteliali con caratteristiche variabili, da piccole lesioni spesso peduncolate a grandi tumori solitamente sessili, di tipo tubulare nel 90% dei casi e molto più raramente di tipo villosa o tubulo-villosa. La loro prevalenza, stimata intorno al 20-30% nei soggetti con età inferiore a 40 anni, raggiunge il 40-50% dopo i 60 anni. Non esiste una differenza significativa fra i due sessi, allo stesso tempo la predisposizione familiare risulta importante. Il rischio che un polipo contenga zone di trasformazione maligna è maggiore per le lesioni multiple, di dimensioni maggiori e con istologia villosa.

Attualmente si ritiene che esistano due vie di sviluppo del carcinoma colico patogeneticamente distinte, entrambe dovute ad accumulo progressivo di mutazioni multiple che interferiscono con i processi di crescita, sopravvivenza e differenziazione della cellula epiteliale.⁶¹ Nello specifico, le mutazioni geniche insorgono secondo un ordine temporale abbastanza preciso e, solitamente, il “primo evento” riguarda il gene APC (localizzato nella regione cromosomica 5q). Questo gene oncosoppressore codifica per l'omonima proteina APC che, in condizioni fisiologiche, si lega a fasci di microtubuli e favorisce la migrazione e l'adesione cellulare. L'APC regola allo stesso tempo i livelli di β -catenina, proteina anch'essa coinvolta nei processi di adesione cellula-cellula, legando i recettori della caderina ai filamenti di actina del citoscheletro, e nella via di segnalazione Wnt, responsabile dello sviluppo cellulare intestinale normale. L'assenza di una proteina APC perfettamente funzionante conduce all'accumulo di β -catenina nel citoplasma e alla sua successiva traslocazione nel nucleo, dove lega fattori di trascrizione Tcf/LEFs (T-cell factors/Lymphoid Enhancer Factors), che a loro volta attivano una serie di geni, tra cui c-Myc e cyclinD1, i quali stimolano la proliferazione cellulare e inibiscono l'apoptosi. Il gene APC risulta difettivo in oltre l'80% degli adenomi e dei carcinomi ad insorgenza spontanea, mentre nel 50% dei tumori senza mutazione di APC risulta mutata la β -catenina.⁶²⁻⁶³ La mutazione di una singola copia di APC non è sufficiente a provocare l'insorgenza del tumore, ma rende l'epitelio della mucosa colica più suscettibile ad accumulare successive alterazioni geniche, che rappresentano steps ulteriori nella carcinogenesi. Qualora essa si verifichi anche sulla seconda copia, la cellula sfugge al controllo del ciclo cellulare e inizia a dividersi e moltiplicarsi, portando alla formazione di una polipo adenomatoso. Uno dei geni coinvolti in un secondo momento è il protooncogene *KRAS*, localizzato sul cromosoma 12 e coinvolto nella trasduzione intracellulare del segnale di una via che, in presenza di una sua mutazione, risulta costitutivamente attiva e stimola quindi in modo continuativo la proliferazione cellulare. Mutazioni di *KRAS* sono presenti in meno del 10% degli adenomi inferiori ad 1 cm, nel 50% circa dei rimanenti adenomi e dei tumori colorettali.⁶⁴ Un altro

elemento di frequente riscontro durante l'evoluzione neoplastica è la perdita delle SMAD (SMAD2 e SMAD4; Small Mother Against Decapentaplegic), localizzate in 18q21 e coinvolte nella via di segnalazione di TGF- β , il cui effetto sembra essere quello di accelerare la progressione negli stadi tardivi della cancerogenesi. Allo stesso modo, l'attivazione delle telomerasi mantiene la stabilità del telomero che rende la cellula immortale. Infine, nel 70-80% dei CRC, è presente la mutazione o la perdita allelica di p53 nella regione cromosomica 17p, associata alla stimolazione tardiva dell'invasione neoplastica.⁶⁵

Come espresso a riguardo delle sindromi familiari, lo studio della loro patogenesi ha consentito di chiarire che, parallelamente alla suddetta via di APC/ β -catenina, esiste una seconda strada che può condurre alla cancerogenesi coloretale, caratterizzata da alterazioni nei geni del mismatch repair (MMR genes).⁶⁶⁻⁶⁸ Questa via è implicata nello sviluppo del 10-15% dei carcinomi coloretali sporadici e nell'HNPCC ed è caratterizzata dall'inattivazione di uno qualsiasi dei cinque geni (hMSH2 2p22, hMLH1 3p21, MSH6 2p21, hPMS1 2q31-33, hPMS2 7p22) deputati alla verifica e alla correzione di errori del DNA. Queste mutazioni, quando presenti, comportano anomalie in sequenze di DNA ripetitivo, i microsatelliti, che configurano il quadro di "instabilità dei microsatelliti".⁶⁷⁻⁶⁸

1.5 Stadiazione e prognosi

Nel tempo si sono succeduti vari sistemi di stadiazione per il CRC, il primo dei quali introdotto da Dukes nel 1932 e successivamente modificato, sia da Astler-Coller nel 1954 sia da Turnball nel 1967, fino ad arrivare a quello attualmente adottato negli Stati Uniti e in Europa, il sistema TNM. Esso, raccomandato dall'AJCC (American Joint Committee on Cancer) già a partire dal 1950, fa maggiore chiarezza rispetto ai precedenti e fornisce informazioni più dettagliate. Vengono presi in considerazione tre parametri che definiscono lo stadio della malattia: T (Tumor) che ne indica l'estensione locale, N (Nodes) l'entità del coinvolgimento linfonodale e M (Metastasis) la presenza di localizzazioni a distanza.

(Tabelle 1-2)

Il sistema viene continuamente revisionato: la settima e più recente edizione ha inserito variazioni importanti dividendo ad esempio lo stadio T4 in 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 diversa prognosi. La classificazione può essere clinica (cTNM), impiegata nella scelta terapeutica, o patologica post-chirurgica (pTNM), dall'importante valore prognostico. È stato, inoltre, introdotto il prefisso "y" (yTNM) per indicare la stadiazione patologica dopo terapia neoadiuvante. I tumori resecati in modo radicale sono classificati come R0, resezioni tumorali con margini positivi sono definite R1, mentre la persistenza di tumore macroscopico per incompleta resezione è indicata con R2.³⁹ Tutto il sistema TNM è ulteriormente semplificato e classificato in stadi clinici su cui si basa la scelta terapeutica, mentre la prognosi è definita da numerosi fattori tra cui, anche in questo caso, il più importante risulta essere lo stadio.

(Tabelle 3-4)

Negli stadi iniziali della malattia la sopravvivenza a 5 anni è superiore all'80%, mentre in caso di malattia metastatica, ad oggi la mediana di sopravvivenza supera di poco i 20 mesi.

Tabella 1. Stadiazione di Dukes modificata

STADIO A	Tumore limitato alla mucosa
STADIO B1	Tumore non esteso oltre la muscolare propria, senza coinvolgimento linfonodale
STADIO B2	Tumore esteso oltre la muscolare propria, senza coinvolgimento linfonodale
STADIO C1	Stadio B1 con metastasi ai linfonodi regionali
STADIO C2	Stadio B2 con metastasi ai linfonodi regionali
STADIO D	Presenza di metastasi a distanza

Tabella 2. Stadiazione TNM

T-Tumore primitivo	
Tx	Tumore primitivo non definibile
T0	Nessuna evidenza di tumore primitivo
Tis	Carcinoma in situ: intraepiteliale o invasione della tonaca propria della mucosa
T1	Tumore che infiltra la sottomucosa
T2	Tumore che infiltra la tonaca muscolare
T3	Tumore che infiltra a tutto spessore la tonaca muscolare con invasione della sottosierosa o dei tessuti pericolici o perirettali non rivestiti da sierosa: pT3a: minima invasione (<1 mm oltre la muscolare propria) pT3b: invasione >5 mm oltre la muscolare propria pT3c: invasione moderata (5-15 mm oltre la muscolare propria) pT3d: invasione estesa (oltre 15 mm oltre la muscolare propria)
T4	Tumore che infiltra direttamente altri organi o strutture e/o il peritoneo viscerale

N-Linfonodi regionali	
Nx	Linfonodi regionali non possono essere accertati
N0	Linfonodi regionali liberi da metastasi
N1	Metastasi in 1-3 linfonodi regionali: N1a: metastasi in un linfonodo regionale N1b: metastasi in 2-3 linfonodi regionali N1c: depositi tumorali nella sottosierosa, nel mesentere o nei tessuti pericolici o perirettali non ricoperti da peritoneo, in assenza di metastasi nei linfonodi regionali
N2	Metastasi in 4 o più linfonodi regionali: N2a: metastasi in 4-6 infonodi regionali N2b: metastasi in >7 linfonodi regionali
M- Metastasi a distanza	
Mx	Presenza di metastasi non accertabile
M0	Assenza di metastasi a distanza
M1	Presenza di metastasi a distanza: M1a: metastasi confinate a un solo organo o sito (ad esempio: fegato, polmone, ovaio, linfonodi non regionali) M1b: metastasi in più di un organo o sito o a livello del peritoneo

Tabella 3. Stadiazione clinica

Stadio 0	Tis	N0	M0
Stadio 1	T1-2	N0	M0
1A	T1		
1B	T2		
Stadio 2	T3-4	N0	M0
2A	T3		
2B	T4		
Stadio 3	Ogni T	N1-2	M0
3A	T1-2	N1	
3B	T3-4	N1	
3C	Ogni T	N2	
Stadio 4	Ogni T	Ogni N	M1

Tabella 4. Confronto tra stadiazione clinica, TNM, tassi di sopravvivenza e classificazione di Dukes modificata da Astler-Coller

Stadio	T	N	M	Sopravvivenza	Dukes modificata
0	Tis	N0	M0	100%	A
1A	T1	N0	M0	90-100%	A
1B	T2	N0	M0	93.2%	B1
2A	T3	N0	M0	87.5%	B2
2B	T4	N0	M0	71.5%	B2
3A	T1-2	N1	M0	87.7%	C1
3B	T3-4	N1	M0	68.7%	C1
3C	Ogni T	N2	M0	27.1-50.5%	C2
4	Ogni T	Ogni N	M1	8.1%	D

1.6 Presentazione clinica e diagnosi

Il corredo sintomatologico nel CRC è diverso in funzione della sede di insorgenza, dell'estensione locale e a distanza della malattia e dell'eventuale presenza di complicanze.⁶⁹ Nella maggior parte dei casi, soprattutto negli stadi iniziali, la malattia si mantiene asintomatica e può esser diagnosticata soltanto accidentalmente o mediante programmi di screening, oppure presenta una sintomatologia vaga e sfumata, aspecifica e difficilmente correlabile al carcinoma.

Le lesioni del colon destro sono in genere vegetanti e spesso di notevoli dimensioni, talvolta ulcerate e sanguinanti. Dal momento che si sviluppano in un tratto di intestino con ampio diametro e lume, questi tumori raramente provocano ostruzione al transito e occlusione intestinale. Più frequentemente, invece, essi rimangono a lungo asintomatici o tendono a manifestarsi con segni e sintomi della sindrome anemica sideropenica, come conseguenza di uno stitico ematico cronico. All'astenia, all'anoressia e al calo ponderale si può associare un dolore di tipo gravativo e subcontinuo ai quadranti addominali di destra e, talvolta, all'epigastrio e una vaga sintomatologia dispeptica. Nelle fasi avanzate della malattia si può riscontrare una massa palpabile in fossa iliaca destra, così come abbondanti sanguinamenti, melena e uno spiccato dimagrimento, fino alla cachessia.

Al contrario, a livello del colon di sinistra, sia per il lume intestinale di calibro inferiore, sia per la tendenza allo sviluppo infiltrante e anulare-stenosante delle neoformazioni, il quadro clinico si manifesta di solito più precocemente. Sono più frequenti gli eventi ostruttivi e le alterazioni dell'alvo, con una caratteristica alternanza tra diarrea e stipsi. Dolori addominali intermittenti e di intensità variabile a livello dei quadranti sinistri o diffusi sono spesso presenti, così come l'emissione di sangue con le feci, talvolta associato a muco.

Le neoplasie del retto sono prevalentemente ulcerate e vegetanti e si manifestano in modo diverso a seconda della sede sopra-ampollare, ampollare o sotto-ampollare. Le prime danno un quadro analogo ai tumori del colon sinistro, in quelle ampollari prevale il tenesmo

(sensazione di corpo estraneo e di peso), talvolta con dolore gravativo e rettorragia con mucorrea, mentre in quelle sotto-ampollari al tenesmo e ad un dolore perineale e perianale si associa l'evacuazione di feci nastriformi frammiste a sangue e muco.³⁶

Talvolta il CRC può manifestarsi con quadri di perforazione o di occlusione/sub-occlusione intestinale, che possono complicarsi determinando una peritonite diffusa o un processo flogistico peritoneale circoscritto, oltre che la formazione di tratti fistolosi nell'ambito degli organi vicini (fistole colo-enteriche, colo-vescicali, colo-uterine). L'esordio acuto della malattia è considerato un fattore prognostico sfavorevole, cui si associa un crollo della sopravvivenza a 5 anni e una maggiore mortalità intraoperatoria, soprattutto se presente sia occlusione sia perforazione; tale impatto prognostico è spesso verosimilmente legato alla fase tardiva cui si giunge alla diagnosi.⁷⁰ Nel 10-15% dei casi la diagnosi di tumore coloretale è posta quando la malattia ha già dato manifestazioni a distanza, quali classicamente le metastasi epatiche. Queste sono spesso asintomatiche, ma possono determinare dolore o, più spesso, una sensazione gravativa a livello dell'ipocondrio destro, fino a quadri rari conclamati di ittero e ascite, secondari alla compromissione della funzionalità dell'organo interessato.

Questo tipo di neoplasia può diffondere attraverso varie vie: per continuità, per contiguità, per propagazione endocavitaria, per via linfatica ed ematica.³⁶

La diffusione per continuità avviene per infiltrazione neoplastica lungo la parete intestinale e nel suo spessore, con un peggioramento della prognosi all'incrementare della profondità di invasione, che è correlato al maggior rischio di diffusione per via ematica. La propagazione per contiguità si verifica attraverso la progressiva infiltrazione del tumore negli organi circostanti (duodeno o rene destro per quelli del colon destro; stomaco o omento per quelli del colon trasverso; milza, coda del pancreas, rene sinistro e diaframma per quelli della flessura splenica; cupola vescicale o utero per quelli del sigma o del cieco), con possibile fistolizzazione nelle anse del tenue, nella vescica, nella vagina o nello stomaco. Qualunque carcinoma, indipendentemente dalla sede primitiva,

può infiltrare la parete addominale. La propagazione endocavitaria si verifica per esfoliazione delle cellule tumorali nella cavità peritoneale, a determinare lesioni voluminose o molto piccole e numerose (quadro della carcinosi peritoneale). La diffusione per via linfatica e per via ematica permette alla malattia di localizzarsi a distanza dalla sede del tumore primitivo. Nel primo caso occorre distinguere il drenaggio linfatico del colon da quello del retto. Per il colon, infatti, le prime stazioni linfatiche ad essere coinvolte sono quelle epicoliche, seguite da quelle intermedie (lungo i vasi colici e sigmoidei) e da quelle principali (lungo le arterie mesenteriche). Il drenaggio linfatico del retto segue invece tre principali direzioni: una via superiore che, lungo il decorso dell'arteria emorroidaria superiore, raggiunge nel mesosigma i linfonodi principali; una via intermedia, che segue i vasi emorroidari medi fino a pervenire ai linfonodi ipogastrici a ridosso della parete pelvica; una via inferiore che, lungo i vasi emorroidari inferiori, giunge ai linfonodi inguino-crurali. La diffusione ematogena è responsabile, in caso di neoplasie del colon e del segmento superiore del retto, della metastatizzazione principalmente epatica. Il fegato costituisce la prima stazione di filtro dei segmenti drenati dalle vene tributarie del sistema portale. Il sangue refluo dal retto medio e inferiore raggiunge, invece, la vena cava inferiore attraverso le vene emorroidarie medie e inferiori. In questo caso la prima stazione di filtro è, quindi, la più frequente sede di metastasi ematogena è rappresentata dal polmone. La presenza di numerose anastomosi porto-cavali rende, d'altra parte, ragione della relativa facilità con cui cellule neoplastiche dai distretti drenati dalla vena porta raggiungono comunque, in prima istanza, il polmone. Allo stesso modo le anastomosi con il plesso venoso vertebrale spiegano la frequenza delle metastasi in questa sede, soprattutto per lesioni primitive del retto medio e inferiore.⁶⁹

La diagnosi di certezza del tumore del colon-retto si ottiene sulla base dei risultati della colonscopia o della sigmoidoscopia a cui si associa biopsia e successivo esame istologico. Prima del trattamento, la cui strategia è guidata da un'adeguata stadiazione, è necessario eseguire un'anamnesi approfondita e l'esame obiettivo, che non può prescindere

dall'esplorazione rettale. Questa manovra può infatti consentire di apprezzare la neoformazione e di porre diagnosi nel 10-15% delle neoplasie del retto basso, con un'accuratezza estremamente variabile in base all'esperienza del clinico e al tipo di lesione.⁷¹ A completamento diagnostico e stadiativo devono essere eseguiti esami strumentali per la valutazione dell'estensione locoregionale della malattia e per l'identificazione di eventuali metastasi a distanza.

La colonscopia è considerata l'esame strumentale più importante per la diagnosi di CRC in quanto consente la visualizzazione endoscopica diretta di tutto l'intestino crasso, fino alla valvola ileo-cecale, con una sensibilità del 97% e una specificità del 98%. Essa permette l'identificazione di eventuali neoformazioni multiple sincrone, l'esecuzione di prelievi biotici su lesioni sospette e, dal punto di vista terapeutico, l'asportazione di lesioni polipoidi sospette. L'esame endoscopico è però gravato dal rischio di complicanze, tra cui la perforazione intestinale iatrogena (0.1%) e l'emorragia di grado elevato (0.3%) con una mortalità dello 0.01-0.03%.⁶⁹ La rettosigmoidoscopia è in grado di studiare circa 60 cm di intestino crasso a partire dall'ano, con una sensibilità e una specificità, in questo tratto esplorabile, simili a quelle della colonscopia, ma con un minor rischio di perforazione. L'impiego di sonde ecografiche o di ecoendoscopi ha inoltre il vantaggio di stimare il grado di infiltrazione della parete e di fornire informazioni sullo stato linfonodale. Fra gli esami radiologici il clisma opaco conserva ancora un ruolo nella diagnosi di carcinoma del colon-retto. Grazie ad una sensibilità del 55-95% esso risulta utile soprattutto nei casi in cui non sia effettuabile una pancolonscopia a causa di motivi anatomici, quali il dolicolon o sindromi aderenziali, o qualora siano presenti lesioni stenosanti non transitabili con il colonscopio. Una tecnica radiologica di recente introduzione è rappresentata dalla TC-colonscopia (o colonscopia virtuale), tecnica che accoppia la procedura del clisma con doppio contrasto alla TC tridimensionale al fine di ottenere una ricostruzione dell'intestino crasso. Essa può essere utile nell'identificazione di lesioni coliche o polipi che possono non esser stati individuati dalla colonscopia, nella localizzazione esatta della neoplasia e

nell'approccio chirurgico, soprattutto in pazienti candidati ad un intervento laparoscopico.⁷²⁻⁷⁴ A svantaggio di questa metodica rimangono l'impossibilità di eseguire prelievi biotici per accertare l'istologia di lesioni sospette e la necessità che sia affidata a personale esperto. Per tale motivo, la colonscopia virtuale rimane ancora in fase di studio e, per i costi e per l'impegno richiesti, non può essere proposta come metodica di screening. Tuttavia nei centri con alta esperienza può essere considerata un'alternativa al clisma opaco.⁷²⁻⁷³ L'ecografia addomino-pelvica è, prevalentemente, indicata per la ricerca di metastasi epatiche, nel cui ambito, se in mano ad operatori esperti, può avere una sensibilità prossima a quella della TC. La TC risulta essere, infatti, una tecnica di imaging fondamentale nella valutazione dell'estensione pelvica locale della malattia e dell'interessamento linfonodale regionale e trova indicazione, inoltre, nella ricerca di metastasi a distanza.

Un utilizzo della PET con 18-fluoro-2-desossi-D-glucosio (FDG-PET) non è raccomandato al momento della diagnosi iniziale.⁷⁵

Nei pazienti con carcinoma del retto la valutazione dell'estensione locale del tumore è essenziale per un trattamento ottimale. La Risonanza Magnetica (RM) ad alta risoluzione può essere utilizzata per misurare accuratamente la diffusione del tumore nel mesoretto circostante e per valutare il margine di resezione circonfenziale tra il bordo del tumore e la fascia del retto.⁷⁶ Essa può essere associata all'ecografia endorettale, metodica con una buona affidabilità nella stima dell'invasione nello spessore parietale del retto, ma il cui utilizzo in questo ambito è limitato dalla presenza di lesioni ostruttive e dall'impossibile valutazione accurata dell'impegno linfonodale.

Nei pazienti con sospette metastasi epatiche da cancro del colon, l'estensione della malattia è determinata da ecografia, TC e Risonanza Magnetica. Ad esse possono associarsi altre metodiche che permettano sia una miglior caratterizzazione delle lesioni, quali un'ecografia o una RM potenziate, sia l'esclusione della diffusione extraepatica della malattia, come nel caso della FDG-PET.⁷⁷⁻⁷⁸

La rilevazione di carcinosi peritoneale con l'imaging rimane una sfida e le prestazioni dei differenti metodi diagnostici sono inadeguate.⁷⁹

Gli esami di laboratorio possono fornire informazioni utili, ma nessun marcatore tumorale tra i molteplici studiati è risultato poter consentire una diagnosi precoce in modo sufficientemente specifico. Tuttavia, nella pratica clinica, si ricorre abitualmente al dosaggio di CEA (CarcinoEmbryonic Antigen) e CA 19.9, utili nella stadiazione pre-operatoria, nel follow-up post-resezione chirurgica e nella valutazione della risposta terapeutica. In alcuni casi di carcinoma mucinoso, può risultare utile il dosaggio di CA 125.

Capitolo 2. Trattamento del tumore del colon-retto

2.1 Terapia della malattia localizzata

2.1.1 Cenni di terapia chirurgica

Una volta diagnosticato un tumore del colon-retto, le decisioni in termini di trattamento vengono prese basandosi innanzitutto sulle caratteristiche della neoplasia, espresse attraverso la stadiazione clinica e quindi la classificazione TNM. Sarà necessario, comunque, andare a plasmare l'intero percorso terapeutico su ogni singolo paziente valutandone le condizioni generali, l'età, il PS (Performance Status), eventuali comorbidità e tutto ciò che ci possa indirizzare nelle scelte verso una maggior efficacia del trattamento associata a minor tossicità.

Su indicazione della stadiazione clinica possiamo suddividere la malattia in una forma localizzata (rappresentata dagli stadi I, II e III) e in una forma avanzata, metastatica (IV stadio). La malattia localizzata comprende tutti i casi in cui non siano presenti metastasi e in particolare si suddivide in uno stadio I (T1-2N0M0) o II (T3-4N0M0) in cui il tumore invade in profondità la parete fino alla sottomucosa (T1), alla muscolare propria (T2), alla sottosierosa o ai tessuti pericolici quando essa non è presente (T3), o ad altri organi/strutture adiacenti (T4), senza interessare linfonodi (N0) o dare secondarismi a distanza (M0). Una neoplasia in III stadio avrà invece un'estensione locoregionale variabile (qualsiasi T), coinvolgimento linfonodale (N+), ma assenza di metastasi a distanza (M0), presenti invece nello stadio IV (qualsiasi T e N, M1).

La chirurgia di elezione rappresenta il primo e più importante approccio terapeutico con intento curativo per i CRC dei primi tre stadi. Affinché il trattamento abbia radicalità oncologica è necessario che il tratto intestinale sede della neoplasia, che viene resecato, abbia margini di sicurezza prossimale e distale sufficientemente ampi (almeno 5 cm) e che venga asportato il rispettivo peduncolo vascolare all'origine, così da effettuare un'adeguata dissezione linfonodale regionale. Se risultano infiltrati organi vicini, questi devono essere asportati in blocco insieme alla lesione primitiva.

La radicalità deve essere confermata sia dal giudizio intraoperatorio (assenza di residui macroscopici), sia dal successivo esame istologico microscopico. L'estensione della resezione è, quindi, strettamente dipendente dalla sede, dalla vascolarizzazione e dal drenaggio linfatico tumorale, oltre che dalla presenza o meno di una diretta invasione a carico degli organi adiacenti. Ovviamente risulta fondamentale anche il ripristino della continuità del tratto gastroenterico in seguito alla resezione, in modo che le estremità dell'intestino si raggiungano senza tensione e abbiano un'adeguata vascolarizzazione.⁸⁰ La chirurgia del tumore del colon, sino alla fine agli anni ottanta, si fondava sulla tecnica "notouch", definita da Turnbull⁸¹ nel decennio precedente. Il razionale di tale procedura poggiava sull'osservazione che la manipolazione della massa neoplastica in corso di intervento chirurgico potrebbe facilitare la disseminazione di cellule neoplastiche nel circolo plasmatico e la conseguente colonizzazione a distanza.⁸² I sostenitori di tale ipotesi ritenevano che la legatura dei vasi arteriosi e venosi prima della mobilizzazione di colon e mesentere determinasse un aumento della sopravvivenza a lungo termine. Queste convinzioni, nel tempo, sono state negate da uno studio randomizzato che, confrontando tale procedura con una tecnica resettiva convenzionale, dimostrava la sovrapponibilità di risultati e complicanze fra le due modalità di intervento chirurgico.⁸³

La linfadenectomia non ha tanto il ruolo di prolungare la sopravvivenza del paziente aumentando la probabilità di aver eseguito un intervento radicale, quanto piuttosto quello di migliorare l'accuratezza della conseguente stadiazione patologica e di fornire indicazioni prognostiche. Il coinvolgimento linfonodale riduce, infatti, la sopravvivenza di coloro che sono affetti da CRC. L'indagine retrospettiva condotta da Sugabaker⁸⁴ nel 1982 mostra che la linfadenectomia estesa è in grado di conferire un moderato vantaggio (5%) nella sopravvivenza a lungo termine. Oggi il numero minimo di linfonodi da reperire nel pezzo operatorio, con l'obiettivo di ottenere una corretta stadiazione della neoplasia, è riconosciuto dai vari autori pari a 12. Un adeguato campionamento linfonodale è quindi indispensabile per stadiale il tumore

e per definire se e quale trattamento post-operatorio debba essere somministrato.

Essendo i tipi di intervento chirurgico e le tecniche attuabili varie, la scelta viene fatta in base a considerazioni oncologiche e anatomiche. E' possibile eseguire:

- emicolectomia destra per tumori del cieco, colon ascendente, flessura epatica e trasverso prossimale;
- emicolectomia sinistra per tumori del trasverso distale, della flessura splenica e del colon discendente;
- colectomia subtotala o totale per tumori multipli sincroni o adenomatosi colica;
- resezione colica segmentaria a scopo palliativo, nei tumori con metastasi non resecabili, o a scopo curativo negli adenomi cancerizzati che hanno indicazione chirurgica.

Per tumori della sezione colica destra o trasversa prossimale si procede quindi con resezione del tratto intestinale comprendente le arterie ileo-coliche, coliche destre e medio-coliche. In caso di neoplasia del colon sinistro la resezione deve includere l'arteria colica sinistra mentre l'interessamento del sigma prevede l'asportazione dell'arteria rettale superiore. La presenza di multiple neoplasie introduce l'opzione terapeutica di colectomia subtotala o totale. La possibilità di eseguire questa procedura demolitiva va valutata attentamente, soprattutto nel paziente anziano e nel soggetto candidato ad una successiva terapia adiuvante. L'asportazione dell'intero tratto colico può, infatti, determinare maggiori complicanze, in particolar modo dal punto di vista evacuativo, ed esclude il successivo potenziale utilizzo di alcuni farmaci chemioterapici tra cui l'irinotecan.

L'approccio può essere sia laparotomico sia laparoscopico con risultati a lungo termine sovrapponibili, a patto che la tecnica laparoscopica venga eseguita da personale esperto e in centri specializzati. Quest'ultima ha dei vantaggi in termini di minor dolore post-operatorio, precoce ripresa dell'alimentazione e delle attività quotidiane e miglior risultato estetico,

permettendo, inoltre, di anticipare sia la dimissione del paziente sia l'inizio della successiva eventuale terapia medica adiuvante.

In circa il 20% dei casi si è costretti ad una chirurgia d'urgenza per un'occlusione o una perforazione intestinale, casi in cui la mortalità peri-operatoria è tripla rispetto agli interventi in elezione.

Per quanto riguarda il carcinoma del retto, in passato il “gold-standard” per il trattamento chirurgico era rappresentato dalla resezione addomino-perineale, chiamata anche “tecnica secondo Miles”. La procedura prevede la rimozione di ano e retto, seguita dalla chiusura del piano perineale, e la colostomia terminale definitiva, con la creazione di un ano artificiale a livello della parete addominale, generalmente in fossa iliaca sinistra. Le strategie d'intervento sono cambiate negli anni e oggi si diversificano in base alla localizzazione della neoplasia, tanto che la resezione secondo Miles attualmente è riservata solo ai casi di neoplasia del retto basso (a meno di 2 centimetri di distanza dal margine anale), mentre in caso di tumore a livello della giunzione sigmoideo-rettale, del retto superiore o medio, si attua la “resezione anteriore del retto” (RAR). La RAR è una tecnica meno demolitiva che permette la conservazione di uno sfintere anale anatomicamente e funzionalmente integro. Questo cambiamento è stato permesso dall'introduzione delle suturatrici meccaniche e dall'impiego di chemio- e radio-terapia neoadiuvante, allo scopo di ridurre le dimensioni della neoplasia e di aumentare le probabilità di una successiva eradicazione chirurgica della massa tumorale. La radicalità dell'intervento chirurgico non può prescindere dall'asportazione, fino al piano dei muscoli elevatori, di tutta quella struttura cellulo-adiposa ricca di vasi che circonda il retto, ovvero il mesoretto (Total Mesorectal Excision, TME).⁸⁵⁻⁸⁶ Oggi la chirurgia del carcinoma rettale assicura una buona resecabilità della malattia con una mortalità intra-operatoria inferiore al 5%. La resezione del carcinoma primitivo del retto, diversamente dalla localizzazione colica, è indicata e raccomandata anche in presenza di metastasi a distanza non asportabili chirurgicamente, date le possibili complicanze secondarie alla neoplasia a tale livello: perforazione, sanguinamento, diffusione linfonodale.

Un'eventuale inadeguata resezione della neoplasia primitiva costituisce il principale fattore di rischio per la recidiva locale e tale fallimento si presenta ad oggi dal 5 al 50% dei casi.⁸⁷

2.1.2 Cenni di chemioterapia adiuvante

La sopravvivenza dei pazienti con CRC a 5 anni, con il solo intervento chirurgico, è dell'85-95% nello stadio I, del 60-80% nello stadio II e del 30-60% nello stadio III. Da questo derivano indicazioni diverse ad un eventuale trattamento adiuvante sistemico.

Questo tipo di terapia, quando necessaria, dovrebbe essere iniziata entro 6-8 settimane dall'intervento chirurgico, poiché inizi più tardivi ne riducono il potenziale beneficio. Nuovi dati suggeriscono che il trattamento medico adiuvante debba essere iniziato il più presto possibile, nel momento in cui le condizioni cliniche del paziente lo permettano, e che, soprattutto se iniziato entro 3 settimane dall'intervento chirurgico, i pazienti con CRC in stadio III siano quelli che maggiormente possono beneficiarne. In casi ad elevato rischio, in cui a causa di complicazioni post-chirurgiche si sia superato tale intervallo di tempo, il trattamento deve comunque essere considerato discutendone con il paziente rischi e benefici.⁸⁸⁻⁸⁹

Pazienti con CRC in stadio I non necessitano di terapia adiuvante, in letteratura non vi sono evidenze del suo utilizzo. Nello stadio II la questione è controversa: le linee guida internazionali suggeriscono di selezionare pazienti a maggior rischio ai quali somministrare la terapia a scopo preventivo. Complessivamente il beneficio assoluto è del 3-4%.⁹⁰⁻

⁹² Elementi da considerare a questo scopo sono:

- l'infiltrazione per contiguità agli organi vicini (T4b);
- una scarsa differenziazione cellulare (Grading G3, ad eccezione dei tumori MSI-H);
- l'invasione perineurale o linfovaskolare;
- un inadeguato numero di linfonodi analizzati (<12);
- la stabilità dei microsatelliti;
- un esordio clinico con perforazione o occlusione.

Risulta invece più incerto il ruolo di un valore di CEA pre-operatorio > 5 ng/mL.⁹³⁻⁹⁴

L'instabilità microsatellitare (MSI-H) si osserva nella maggior parte dei casi di CRC sporadico e si correla ad un'aumentata sopravvivenza, oltre che all'assenza di benefici a seguito di terapia adiuvante. Essa rappresenta, quindi, un reperto con significato prognostico positivo in presenza del quale, se considerato singolarmente, è sufficiente procedere con semplice follow-up (ecografia e colonscopia), al contrario, per una stabilità microsatellitare (MSI-S) è previsto l'intervento chemioterapico adiuvante.

I pazienti dello stadio III sono, invece, sempre candidati a ricevere chemioterapia post-chirurgica. Questa ha dimostrato determinare una riduzione del rischio relativo di morte del 33% e un beneficio assoluto in termini di sopravvivenza del 10-15%, aumentando la sopravvivenza libera da progressione (Progression Free Survivor, PFS) a 5 anni dal 55 al 67% e la sopravvivenza globale (Overall Survival, OS) dal 64 al 71%.⁹⁵ Storicamente numerosi studi sono stati eseguiti a riguardo, fin da prima degli anni '90, ma questi avevano a lungo dato esito negativo o risultati marginali e non significativi.⁹⁶⁻¹⁰³ Dati positivi sono, invece, emersi da un piccolo studio condotto da Verhaegen et al., in cui nel gruppo dei pazienti trattati dopo chirurgia con levamisolo si è riportato un suggestivo e statisticamente significativo vantaggio di sopravvivenza rispetto a quelli non trattati.¹⁰⁴ Il levamisolo è stato ampiamente utilizzato come farmaco antielmintico per oltre 20 anni e oggi continua ad esserlo, illegalmente, come adulterante per la cocaina. Questa sostanza ha attirato interesse come antitumorale nel 1970, grazie all'individuazione di un'attività immunostimolante, che ne giustifica l'attuale impiego in ambito reumatologico.¹⁰⁵⁻¹⁰⁶

A questa indagine sono seguiti altri studi sia di conferma sia di approfondimento in cui al levamisolo si è associato il 5-fluorouracile, ottenendo una riduzione generale del tasso di recidiva per il solo levamisolo del 27% e per levamisolo più di 5-FU del 31%, con un vantaggio anche in termini di ritardo nella loro comparsa, nel caso dell'associazione. Suddividendo i pazienti in base allo stadio, il vantaggio

risulta però significativo soltanto in caso dello stadio C/stadio III.¹⁰⁷ L'efficacia della terapia con levamisolo e 5-FU è stata successivamente riconosciuta anche nello stadio B2/stadio II dal momento che il vantaggio in termini di riduzione del tasso di recidiva è risultato essere del 32%, in analogia allo stadio III.¹⁰⁸ La combinazione di 5-fluorouracile e levamisolo, somministrata per un anno successivamente alla chirurgia, è stata, inoltre, il primo regime ad essere inequivocabilmente associato ad un beneficio in termini di sopravvivenza e raccomandato nella pratica clinica per lo stadio C/stadio III nel 1990.¹⁰⁹⁻¹¹⁰ L'impiego del 5-FU è stato successivamente valutato sia in monoterapia, sia in associazione ad altri farmaci ad effetto modulante tra cui l'acido folinico (FA o leucovorin, LV), il methotrexate e l' α -interferone, secondo differenti tempi e modalità di somministrazione. Sulla base dei risultati osservati si è giunti a definire come terapia adiuvante standard l'associazione di 5-FU e LV in somministrazione infusionale mensile o settimanale per almeno 6 mesi.¹¹¹⁻¹¹³

Lo studio IMPACT ha, infatti, evidenziato come una terapia di 6 mesi con 5-fluorouracile associato ad acido folinico, somministrati secondo lo schema Mayo Clinic (5-FU 425 mg/m² + LV 20 mg/m² per 5 giorni consecutivi, ripetuto ogni 28 giorni, per 6 cicli) riduca significativamente la mortalità del 22% (95% CI 3-38; p=0.029) e le recidive di malattia del 35% (22-46; p<0.0001), aumentando la sopravvivenza libera da malattia a 3 anni (EFS) dal 62% al 71% e la sopravvivenza globale (OS) dal 78% all'83%.¹¹³ Valutando nello specifico lo stadio B2/stadio II non si registra un aumento significativo dell'EFS e dell'OS nei pazienti trattati con 5-FU+LV vs placebo (EFS a 5 anni 76% vs 73%, OS a 5 anni 82% vs 80%). Questi dati quindi non supportano l'indicazione all'utilizzo di 5-FU+LV in tutti i pazienti in stadio B2/stadio II di CRC.¹¹⁴

Un ulteriore studio ha comparato l'infusione continua di 5-FU con il classico trattamento adiuvante e.v. in bolo (5-FU/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 "hand foot syndrome" (o sindrome mano-piede), caratterizzata dalla comparsa di

rash eritematoso coinvolgente i palmi delle mani e le piante dei piedi. Il 5-FU ha una breve emivita, quindi, l'utilizzo del farmaco in infusione continua servirebbe a reclutare un maggior numero di cellule in fase S, la fase più suscettibile al trattamento. Essa consente, inoltre, di aumentare l'intensità di dose senza che a ciò corrisponda un incremento delle tossicità.¹¹⁵ Dal presupposto che uno stesso farmaco somministrato in due diversi modi possa sfruttare meccanismi differenti di inibizione, sia di RNA, sia di DNA, sono stati messi a punto degli schemi ibridi. Attualmente il più utilizzato prevede una combinazione di LV, 5-FU in bolo e 5-FU in infusione (da somministrarsi in 48 ore) ogni due settimane.

Il gruppo Adjuvant Colon Cancer Endpoints ha valutato l'efficacia della terapia adiuvante con 5-FU in pazienti con CRC in stadio II e III, tramite un'analisi sui dati di singoli pazienti (più di 20.800) trattati nell'ambito di 18 studi sulla terapia adiuvante. E' stato dimostrato un significativo beneficio della terapia adiuvante in termini di OS negli 8 anni di follow-up. I tassi di recidiva si riducevano all'aumentare del tempo trascorso dall'intervento: in particolare dopo 5 e 8 anni sono stati osservati dei tassi di recidiva inferiori al 1.5% a allo 0.5%, rispettivamente. Nei pazienti in stadio III il tasso di OS a 8 anni risultava del 42.7% nei pazienti trattati con la sola chirurgia e del 53% nei pazienti sottoposti a terapia adiuvante con 5-FU ($p < 0.0001$); i tassi di OS incrementavano anche nei pazienti in stadio II risultando del 66.8% e del 72.2%, rispettivamente ($p = 0.026$).

I regimi chemioterapici a base di oxaliplatino e fluoropirimidine sono attualmente quelli raccomandati dalle principali linee guida per la pratica clinica come terapia adiuvante standard per i pazienti in stadio III completamente resecati e per quelli in stadio II selezionati come ad alto rischio. Il beneficio dovuto a ciò è stato ampiamente dimostrato soprattutto nello stadio III in cui, nei pazienti sottoposti a terapia post-chirurgica, si è rilevata una riduzione del rischio di recidiva del 30% circa e della mortalità dal 22% al 32%.¹¹⁶⁻¹²¹

La grande novità rappresentata dall'introduzione dell'oxaliplatino (diaminocicloesano platino composto) è dovuta prima di tutto allo studio MOSAIC, che ha dimostrato un vantaggio significativo in termini di

sopravvivenza libera da malattia (DFS a 5 anni 73.3% vs 67.4%) e globale (OS) con l'associazione di oxaliplatino, leucovorin e fluorouracile infusione (FOLFOX) rispetto alla terapia standard soltanto con leucovorin e fluorouracile (LV/5-FU). Per quanto l'aggiunta dell'oxaliplatino aumenti le tossicità della chemioterapia, esse risultano transitorie e gestibili con opportuni accorgimenti. La validità della combinazione di 5-FU e oxaliplatino nel trattamento adiuvante del CRC è stata ulteriormente confermata dallo studio NSABPC07 (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) che ha dimostrato come un regime a base oxaliplatino più leucovorin e fluorouracile in bolo (FLOX) aumenti in modo significativo la DFS rispetto al LV/5-FU (76.5% vs 71.6% a 3 anni) con risultati analoghi allo studio MOSAIC e tossicità sovrapponibili, ad eccezione di un incremento degli eventi gastrointestinali. Nel regime FLOX non risulta però alcuna differenza significativa in termini di sopravvivenza globale a 8 anni di follow-up e questo dato ne determina un uso molto limitato.¹¹⁷⁻¹²⁰ Una nota negativa nell'utilizzo dell'oxaliplatino in questo setting è rappresentata da dati che suggeriscono come esso possa ridurre la sopravvivenza dei pazienti dopo recidiva.¹²¹

Un'altra importante novità nell'ambito della terapia adiuvante è stata l'introduzione di una terapia orale con capecitabina (XELODA), in alternativa a 5-FU+LV. Un'ampia review ha confrontato l'efficacia e la sicurezza di una terapia adiuvante con capecitabina (con o senza oxaliplatino) vs leucovorin e fluorouracile (con o senza oxaliplatino) in pazienti con tumore del colon al III stadio resecato, raggruppando dati da quattro grandi studi di fase III randomizzati e controllati: NSABP C-08, XELOXA, X-ACT, e AVANT. Da essa emerge una non-inferiorità in termini di efficacia della terapia con XELOX rispetto a 5-FU+LV, sia infusione sia in bolo, e oxaliplatino e un profilo degli eventi avversi più favorevole nel primo caso, con un minor numero di tossicità sia di grado 3-4 correlate all'oxaliplatino (neuropatia, neutropenia, neutropenia febbrile) sia complessive, anche se la sindrome mano-piede di grado 3 è

stata più frequente con capecitabina. La sopravvivenza post-recidiva era, inoltre, simile per le due terapie.¹²²⁻¹²⁴

Fluorouracile e fluoropirimidine orali come la capecitabina condividono lo stesso meccanismo d'azione anti-tumorale, che consiste nell'inibizione della timidilato sintasi attraverso il 5-fluoro-2'-deossiuridina-5'-monofosfato, metabolita del fluorouracile. Tuttavia, la modalità di azione dei farmaci varia in funzione sia del metodo di somministrazione (cioè, orale in un caso e in bolo o infusione continua nell'altro) sia della modulazione mediata dal leucovorin. Quest'ultimo è un precursore del 5,10-metilene-tetraidrofolato, molecola che va a formare un complesso ternario con la timidilato sintasi e il 5-fluoro-2'-deossiuridina-5'-monofosfato, prolungando così l'inibizione della timidilato sintasi. La capecitabina è un precursore del fluorouracile e viene convertita ad esso nel tessuto tumorale per mezzo della timidina fosforilasi; essa non necessita, inoltre, dell'associazione con leucovorin.¹²⁵

Tutti questi dati mostrano chiaramente la possibilità, nella pratica clinica, di somministrare due tipi di chemioterapia adiuvante: una infusionale e l'altra somministrata per via orale, da associare quando possibile a oxaliplatino. La durata ottimale del trattamento adiuvante è attualmente di 6 mesi.

L'utilizzo di fluoropirimidine orali o endovenose in monochemioterapia trova tuttora spazio come valida alternativa in caso di malattia a migliore prognosi (IIIa), soprattutto nei pazienti con ridotto Performance Status.¹²⁶ Pazienti anziani selezionati possono ricevere lo stesso beneficio da una terapia adiuvante a base di fluoropirimidine, analogamente alle loro controparti più giovani, senza un significativo aumento degli effetti tossici.¹²⁷

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 irinotecan non devono essere impiegate nella pratica clinica.¹²⁸⁻¹³⁰

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-retto. I dati con bevacizumab non evidenziano vantaggi e lo studio AVANT sembra, anzi, mostrare un effetto sfavorevole statisticamente significativo in sopravvivenza nell'associazione con il regime FOLFOX4. Il cetuximab allo stesso modo sembra determinare un effetto detrimentalmente nei pazienti *KRAS* mutati ma anche, seppure in misura non statisticamente significativa, nei pazienti *KRAS* wt.¹³¹⁻¹³³

Al fine di selezionare con successo pazienti con maggiori probabilità di beneficiare della chemioterapia adiuvante è opportuno identificare marcatori molecolari di rischio di recidiva tumorale. Numerosi studi hanno valutato gli effetti di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) in geni coinvolti nel metabolismo di oxaliplatino e fluoropirimidine, in meccanismi di riparazione del DNA e nel trasporto dei farmaci. La combinazione dei genotipi di selectina E (SELE) rs3917412 G>A G/G e di metilen-tetraidrofolato reductasi (MTHFR) rs1801133 T/T è associata a rischio significativamente elevato di recidiva. Uno screening per SELE e MTHFR SNPs potrebbe effettivamente classificare i pazienti trattati con chemioterapia adiuvante in gruppi a basso e ad alto rischio di recidiva, risultando così un'arma di importanza anche prognostica. Pertanto, in futuro, le nuove opzioni di trattamento e le strategie più intensive di follow-up potranno forse essere riservate, dopo l'intervento chirurgico, ai pazienti portatori di queste varianti.¹³⁴ Altri studi suggeriscono che SNPs in *CCNH* e *ABCG2* possano modulare lo sviluppo di grave neurotossicità periferica in seguito alla somministrazione di oxaliplatino e che, allo stesso modo, le varianti *DPYD**2A e *D949V* della diidropirimidino-deidrogenasi siano associate ad una maggiore incidenza degli eventi avversi di grado 3 o superiore nei pazienti trattati con combinazione a base di 5-FU o capecitabina, permettendo così un'ulteriore personalizzazione del trattamento adiuvante e non solo.¹³⁵⁻¹³⁶

L'obesità e lo stato sottopeso sono indipendentemente associati ad efficacia minore e a maggior rischio di ricaduta in pazienti con CRC sottoposti a terapia post-chirurgica. Risultati analoghi provengono da pazienti fumatori.¹³⁷⁻¹³⁸

In base all'evidenza disponibile, la radioterapia adiuvante post-operatoria nel carcinoma del colon non deve essere prescritta, anche se un recente studio ha dimostrato come essa possa essere appropriata in pazienti selezionati, una volta sottoposti a resezione con intento curativo, soprattutto in caso di T4b o malattia residua post-chirurgica. La RT determinerebbe, infatti, un maggior controllo locoregionale della malattia e una miglior DFS ($p < 0.05$).¹³⁹

2.2 Terapia della malattia metastatica

2.2.1 Approccio multidisciplinare alla malattia

Il 20-25% dei pazienti con tumore del colon-retto si presentano già al momento della diagnosi nel IV stadio, quello della malattia metastatica, e una percentuale analoga tra coloro che vanno incontro a chirurgia e risultano essere stati operati radicalmente, sviluppa metastasi nel tempo. La valutazione multidisciplinare, ovvero la condivisione del percorso terapeutico tra tutte le possibili figure professionali coinvolte nella gestione del caso (oncologo medico, radioterapista, chirurgo coloretale ed epatico, radiologo, patologo, biologo molecolare) è una tappa fondamentale nell'individualizzazione della strategia terapeutica. Rientrano nella valutazione complessiva del paziente e quindi nella decisione terapeutica fattori clinici legati al paziente stesso e alla sua malattia, tra cui in particolare il concetto di resecabilità chirurgica e, più di recente, fattori molecolari.

2.2.1.1 Fattori clinici e molecolari

Tra i *fattori clinici* ne valutiamo alcuni riguardanti il paziente (Performance Status, età, comorbidità, funzione epatica, psicologia, aspettative e attitudini) e altri il tumore (estensione, sintomi correlati e aggressività clinica, espressa ad esempio dal tempo trascorso tra la diagnosi di malattia e la comparsa di metastasi).

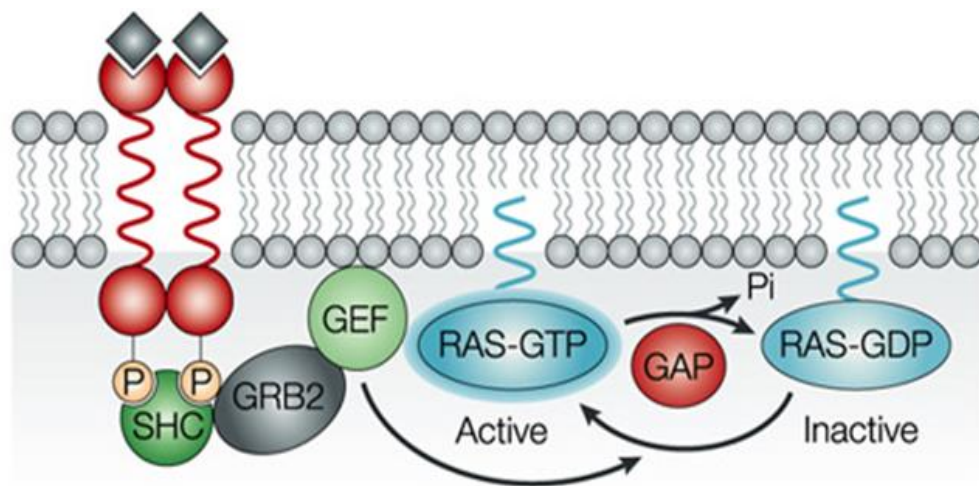
Tra i *fattori molecolari* analizziamo i geni *KRAS* (localizzato sul cromosoma 12; esoni 2/codone 12 e 13, 3/codone 59 e 61, 4/codone 117 e 146), *NRAS* (sul cromosoma 1; esoni 2, 3, 4), *BRAF* (sul cromosoma 7; esone 15/codone 600) ricercando specifiche mutazioni che rappresentano fattori predittivi di resistenza a determinati trattamenti farmacologici e/o fattori prognostici negativi, indici di aggressività della malattia.

I tre geni HRas, KRas e NRas codificano per quattro proteine (HRas, NRas, KRas4A e KRas4B) la cui funzione è quella di regolare lo switch tra GDP e GTP.¹⁴⁰⁻¹⁴³ Le proteine Ras sono posizionate sulla superficie interna della membrana plasmatica dove servono per trasdurre stimoli extracellulari ligando-mediati nel citoplasma e, successivamente, nel

nucleo, allo scopo di controllare la crescita, la differenziazione e l'apoptosi cellulare.¹⁴⁴

L'attività biologica di Ras è regolata da un ciclo GDP/GTP modulato da due tipi di proteine regolatorie: le Guanine Nucleotide Exchange Factors (GEFs; RasGRF/mCDC25, SOS1/2) promuovono la formazione dello stato GTP-attivo, mentre le Ras GTPase Activating Proteins (GAP; p120 GAP, NF1-GAP/ neurofibromina) promuovono la formazione dello stato GDP-inattivo.¹⁴²⁻¹⁴³

L'immagine sottostante¹⁴⁵ riporta i meccanismi di attivazione e inattivazione del ciclo GDP/GTP che regola l'attività biologica di Ras:

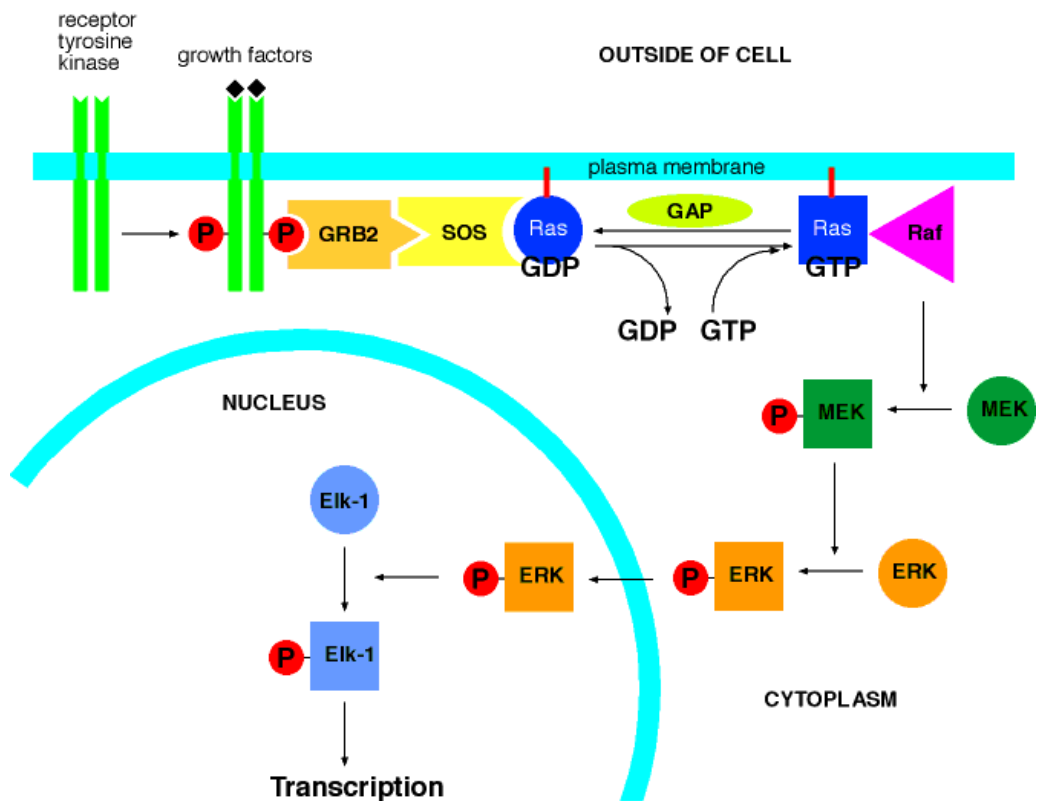


Nature Reviews | Cancer

Sostituzioni di singoli aminoacidi nel codone 12, 13 o 61 creano proteine Ras mutate insensibili allo stimolo di GAP e bloccate nello stato GTP-attivo, che quindi portano ad un'attivazione disregolata di Ras e di tutta la cascata del segnale a valle, mediata da Raf-MEK-MAPK.¹⁴⁶ Ras è un punto di convergenza per molte vie di trasduzione del segnale e le proteine Ras sono fisiologicamente attivate, in modo transitorio, in risposta ad una vasta gamma di segnali extracellulari, quali fattori di crescita, citochine, ormoni e neurotrasmettitori, che stimolano i recettori della superficie cellulare. La via maggiormente studiata coinvolge l'Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor (EGFR), capostipite di una famiglia di recettori (ErbB) comprendente 4 membri: EGFR (Erb1 o

HER1), Erb2 (HER2 o neu), Erb3 (HER3) e Erb4 (HER4).¹⁴⁴ EGFR è stimolato dall'EGF il quale determina un'autofosforilazione del recettore stesso a livello di uno specifico residuo di tirosina citoplasmatico. Da questo processo si genera un sito di legame per altre proteine quali Shc, Grb2 e SOS che forniscono il collegamento tra diversi tipi di recettori di superficie delle cellule attivate e Ras.¹⁴⁷⁻¹⁴⁸ Una volta attivato, Ras trasmette il suo segnale a valle attraverso una cascata di proteine citoplasmatiche, tra cui la serina/treonina chinasi Raf-1, che è stata individuata come effettore critico della funzione dello stesso Ras.¹⁴⁹ Anche il gene che codifica per Raf (in posizione 7q34) è stato ben caratterizzato come proteina GTP-asi coinvolta nella trasduzione del segnale, nella proliferazione cellulare e nella cancerogenesi. Esso codifica per tre possibili isoforme: A-RAF, B-RAF e C-RAF, derivanti dalla trasduzione di tre diverse molecole di mRNA a seguito di un complesso fenomeno di splicing alternativo. L'attivazione della proteina da questo codificata è mediata da fosforilazioni multiple che si realizzano a livello dei suoi due principali siti di fosforilazione: il residuo aminoacidico di treonina in posizione 599 e quello di serina in posizione 602, entrambi in prossimità del segmento di attivazione chinasi della proteina stessa. Tali siti sono essenziali per garantire il corretto funzionamento della proteina in quanto, se alterati, possono compromettere l'intera regolazione della via di trasduzione e promuovere quindi i processi cellulari che guidano la cancerogenesi. L'associazione Ras/Raf determina la traslocazione della proteina Raf sulla membrana plasmatica e una serie di eventi che portano all'attivazione della sua funzione chinasi. In seguito alla propria attivazione, infatti, Raf stesso fosforila due MAPK chinasi (MAPKKs) ovvero MEK1 e MEK2,¹⁵⁰ le quali a loro volta agiscono su ERK1 e ERK2 (Extracellular Signal Regulated Kinases; ERKs).¹⁵⁰ Le proteine ERKs traslocano, quindi, nel nucleo dove fosforilano e attivano vari substrati tra cui fattori di trascrizione come Elk-1.¹⁵¹

L'immagine sottostante¹⁵² illustra la via di trasduzione del segnale Ras-Raf-MEK-ERK-Elk-1:



La maggior parte delle informazioni che ci hanno permesso di definire la via di trasduzione del segnale di Ras derivano da studi genetici sul moscerino della frutta *Drosophila melanogaster*, sul nematode *Caenorhabditis elegans* e sui lieviti *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*.

In conclusione, Ras e Raf sono proteine coinvolte nella trasduzione del segnale attraverso la cascata Ras-Raf-MEK-ERK che controlla crescita, differenziazione, proliferazione e sopravvivenza cellulare rivestendo così un ruolo di estrema importanza anche nel processo di cancerogenesi, qualora essa sia alterata.¹⁵³⁻¹⁵⁴ L'overespressione e/o l'attivazione incontrollata di tali prodotti genici contribuisce, infatti, alle fasi di iniziazione, progressione e metastatizzazione delle cellule tumorali, guidando i meccanismi di resistenza all'apoptosi, la proliferazione e la migrazione cellulare, l'angiogenesi e l'invasione tissutale.

KRAS e *HRAS* sono stati per primi identificati grazie agli studi di Kitsten e di Harvey sul virus causa del sarcoma murino¹⁵⁵⁻¹⁵⁶ e, successivamente, nelle cellule cancerose umane.¹⁵⁷ La scoperta dell'*NRAS* è avvenuta alcuni anni dopo nelle cellule umane di neuroblastoma.¹⁵⁸

Mutazioni puntiformi attivanti a carico di *RAS* rilevate tramite analisi mutazionale (amplificazione con PCR) determinano un difetto a carico delle GTPasi che causa un'iperattivazione del segnale a cascata e un'attività incontrollata degli effettori a valle come le proteine RAF e le MAP-chinasi.¹⁵⁹ Le mutazioni di *RAS* si riscontrano in circa il 20-25% dei tumori umani¹⁶⁰, mentre nei tumori del colon-retto (CRC) la percentuale delle mutazioni di *KRAS* sale al 40% con un coinvolgimento soprattutto dell'esone 2 (43%) e in particolare del codone 12 (79%) e del codone 13 (17%), identificandosi nella maggior parte dei casi nella sostituzione di una base nucleotidica guanina con un'adenosina (transizione G>A) oppure con una timina (transversione G>T).¹⁶¹ Le mutazioni di *HRAS* sono trascurabili, mentre quelle di *NRAS* si riscontrano nel 3-5% dei CRC, più frequentemente localizzate nel codone 61 (60%).^{154,162}

Negli ultimi anni le mutazioni di *KRAS* sono state ampiamente studiate nei pazienti con carcinoma coloretale metastatico (mCRC) e sono adesso riconosciute come determinanti la resistenza agli anticorpi monoclonali (MoAbs) anti-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) cetuximab e panitumumab.¹⁶³⁻¹⁷⁰ Valutando gli innumerevoli studi a riguardo possiamo porre l'attenzione su una metanalisi pubblicata nel 2012¹⁶⁹ su otto diversi studi e un totale di 6609 pazienti, in cui si riscontra una interazione significativa tra lo stato di *KRAS* e l'outcome clinico in termini sia di PFS (wild type vs mutant, P=0.001) che di RR, Response Ratio (wild type vs mutant, P<0.0001). L'aggiunta di un anticorpo monoclonale anti-EGFR alla chemioterapia di prima linea nel mCRC aumenta la PFS nella popolazione *KRAS* wt (HR=0.91; 95% CI 0.84-0.99; P=0.03), ma ha un effetto detrimentalmente nella popolazione *KRAS* mutata (HR=1.13; 95% CI 1.03-1.25; P=0.013). Un aumento significativo nella probabilità di andare incontro ad una risposta, conseguentemente al trattamento, è evidente nei *KRAS* wt (HR=1.17; 95% CI 1.04-1.33;

P=0.01). In definitiva, gli anticorpi anti-EGFR producono un chiaro beneficio in termini di RR, che si traduce in un piccolo beneficio in PFS, ma soltanto nella popolazione *KRAS* wt.

I tumori *KRAS* mutati sono stati, inoltre, associati a specifiche caratteristiche cliniche quali la localizzazione primaria del tumore al colon destro e il verificarsi più frequentemente di metastasi polmonari e cerebrali rispetto a quelle epatiche.

Uno studio australiano riporta i risultati dello screening per mutazioni di 19 oncogeni in circa cento metastasi da cancro del colon, da cui se ne rilevano in particolare 4 su 19: *BRAF* (3.1%), *KRAS* (48.4%), *NRAS* (6.2%) e *PIK3CA* (16.1%). Analizzando le singole sedi di metastasi, indipendentemente dalla localizzazione del tumore primitivo, la mutazione di *KRAS* aveva una prevalenza significativamente più alta nel polmone (62.0%) e nel cervello (56.5%) rispetto al fegato (32.3%; p=0.003). Allo stesso modo essa era associata a recidiva polmonare (HR=2.1; 95% CI 1.2-3.5, p=0.007), ma non a recidiva epatica nei pazienti dello studio VICTOR, uno studio di fase III con rofecoxib.¹⁷¹⁻¹⁷⁴

In termini prognostici l'effetto delle mutazioni di *KRAS*, sia in adiuvante che nel contesto metastatico, è ancora materia di dibattito nonostante siano state identificate come debole marcatore prognostico negativo in molti studi, quali ad esempio RASCAL, RASCAL II, MRC FOCUS, CALGB 89803, PETACC-3, EORTC 40993 e SAKK 60-00.^{164,175-180} Lo studio RASCAL è stato il primo ad aver cercato di comprenderne il significato prognostico reclutando 2721 pazienti da 22 gruppi in 13 Paesi. L'analisi multivariata ha suggerito che la presenza di una mutazione di *KRAS* aumentava il rischio di recidiva (p<0.001) e di morte (p=0.004). In particolare, qualsiasi mutazione della guanina (G) in timina (T), ma non in adenina (A) o citosina (C), aumentava il rischio di recidiva (P=0.006) e di morte (p<0.001). Lo studio ha mostrato come la mutazione del codone 12, ma non del codone 13, rappresenti un fattore indipendente di aumentato rischio di recidiva (p=0.007) e di morte (p=0.004), correlandosi ad un comportamento più aggressivo della malattia.^{162,175}

Lo studio RASCAL II, eseguito su un campione di pazienti più consistente (n=4268), ha confermato i dati del precedente trial. Soltanto

una delle 12 possibili mutazioni di *KRAS* (p.G12V; da glicina a valina, codone 12), riscontrata nell'8.6% di tutti i pazienti, aveva un impatto statisticamente significativo sulla sopravvivenza libera da fallimento (FFS; $p=0.004$, HR=1.3) e sull'OS ($p=0.008$, HR=1.29), soprattutto nei tumori di stadio Dukes C (FFS: $p=0.008$, HR=1.5; OS: $p=0.02$, HR=1.45) rispetto al Dukes B (FFS: $P=0.46$, HR= 1.12; OS: $P=0.36$, HR=1.15).¹⁷⁶ Lo studio MRC FOCUS conferma come la mutazione di *KRAS*, ma anche quella di *BRAF*, siano fattori prognostici negativi incidendo sull'OS (HR=1.40; 95% CI 1.20-1.65; $P<0.0001$) ma abbiano un impatto minimo sulla PFS (HR=1.16; 95% CI 1.00-1.36; $P=0.05$).¹⁷⁷

Per meglio comprendere il ruolo prognostico di *KRAS*, in relazione allo stadio del CRC e ad altre caratteristiche tumorali di possibile rilievo sull'outcome, è stato condotto uno studio su una popolazione di 1989 pazienti. I *KRAS* mutati (31%) hanno presentato una scarsa PFS (HR=1.37, 95% CI 1.13-1.66) rispetto ai *KRAS* wt, ma non nella malattia di tipo metastatico, portando quindi alla conclusione che la mutazione di *KRAS* si associ ad una sopravvivenza significativamente inferiore rispetto allo stato wt, ma solo nel setting di pazienti non metastatici.¹⁷⁹

Per quanto concerne l'impatto sul meccanismo di cancerogenesi, la mutazione *NRAS*, diversamente da *KRAS*, non sembra essere implicata nella sequenza adenoma-carcinoma, ma piuttosto nell'inibizione dell'apoptosi, processo che di norma avviene fisiologicamente in seguito a stimoli di stress a carico delle cellule epiteliali.¹⁸¹ Le caratteristiche clinico-patologiche e l'impatto prognostico delle mutazioni di *NRAS* sono meno noti, ma sono state individuate con certezza come fattori predittivi affidabili di resistenza alla terapia con anticorpi monoclonali anti-EGFR. In una recente analisi sono state riscontrate mutazioni a carico di *KRAS* o *BRAF* in 393 (50%) e 72 (9%) dei 786 pazienti totali, a cui si aggiungono altri 47 (15%), nell'ambito del sottogruppo *KRAS* e *BRAF* wt, mutati per *NRAS* a livello dei codoni 12 (30%), 13 (13%) e 61 (57%). Le caratteristiche dei tumori *NRAS* e *KRAS* mutati sono risultate pressoché sovrapponibili per quanto riguarda il prevalere di entrambi nell'ambito dei

pazienti di sesso femminile, in sede colica ascendente e la maggior aggressività tumorale, con però una minor incidenza di metastasi polmonari (30% vs 36%, $p=0.012$) e del tipo istologico mucinoso (4% vs 26%, $p=0.012$) negli *NRAS* mutati. In termini clinici un peggior outcome si è riscontrato in generale per i tumori RAS mutati: mentre la OS mediana dei pazienti wt è risultata di 42.7 mesi, quella degli *NRAS* e *KRAS* mutati di 25.6 e 30.2 mesi, rispettivamente (HR=1.91, 95% CI 1.39-3.86, $p=0.0013$). Come prevedibile, inoltre, nessuno dei casi *NRAS* mutato ha presentato risposta al trattamento con farmaci anti-EGFR, confermandone una condizione di resistenza e controindicazione a tale terapia.¹⁸²

Sebbene siano descritte più di 40 differenti possibili mutazioni nel dominio kinasico di *BRAF*, la più comune è la sostituzione GTG-GAG in posizione 1799 dell'esone 15, che risulta nella mutazione dell'aminoacido V600E, riscontrabile in circa l'8-10% dei tumori metastatici del colon-retto. Si tratta di una transversione di una timina con un'adenina (T>A) da cui deriva la sostituzione a livello del codone 600 di un residuo aminoacidico di valina (V) con un acido glutammico (E). L'inserimento del glutammato, carico negativamente, conferisce una carica in grado di mimare la fosforilazione dei residui di treonina 599 e serina 602, conducendo quindi all'attivazione della proteina *BRAF*. Le mutazioni di *BRAF* attivano costitutivamente questa kinasi, in modo analogo al meccanismo *RAS*-indotto, e promuovono quindi la crescita, la sopravvivenza e l'angiogenesi delle cellule tumorali.¹⁶⁹ Nei mCRC la mutazione di *BRAF* ha un impatto prognostico negativo noto, dovuto all'elevata aggressività biologica della malattia, alla ridotta responsività alle terapie standard, alla diffusione peritoneale precoce e all'evolutivezza importante, per cui si rende necessario un approccio intensivo.^{177,183-185} I tumori con *BRAF* mutato condividono, inoltre, alcune caratteristiche istopatologiche e cliniche, verificandosi più frequentemente negli anziani, nelle donne e nel colon destro, con istotipo mucinoso, microsatelliti instabili e frequenti metastasi linfonodali e peritoneali.^{171,183,186-187} Uno studio scandinavo in cui l'analisi molecolare è stata effettuata da un

registro di popolazione, quindi non soltanto nei pazienti arruolati nei vari studi clinici, riporta come i *BRAF* mutati siano addirittura il 21%. Questo dato potrebbe confermare che questi pazienti, che si presentano con una malattia più aggressiva e quindi con condizioni cliniche di partenza meno performanti, siano di più difficile arruolamento negli studi clinici.¹⁸⁸

Due grandi gruppi di pazienti affetti da mCRC sono stati esaminati in un'analisi retrospettiva per lo sviluppo di un nomogramma predittivo dello stato *BRAFV600E*: pazienti di sesso femminile, con tumore al colon destro e istologia mucinosa avevano una mutazione di *BRAF V600E* nell'81% dei casi. Ciò ne determina valore come fattori predittivi indipendenti di questa mutazione.¹⁸⁹

Oltre alla mutazione V600E ne sono state descritte anche altre a carico del gene *BRAF*, di più raro riscontro (<1% dei casi di mCRC), che coinvolgono aminoacidi posizionati in prossimità del sito tirosino-kinasico o del dominio della proteina ricco di residui di glicina, a livello dei codoni 594 e 596. Queste si sono differenziate dalla V600E poiché non hanno mostrato negli studi condotti alcun valore prognostico negativo, né alcuna correlazione con le caratteristiche cliniche e molecolari menzionate per quest'ultima. Questo risultato appare coerente con le evidenze precliniche di un loro effetto di chinasi-inattivazione. I tumori *BRAF* 594 o 596 mutati sono più frequentemente rettali, non mucinosi, in assenza di diffusione peritoneale, mentre non è mai presente instabilità dei microsatelliti. Questi pazienti hanno una miglior prognosi e un'OS marcatamente maggiore se confrontati con quelli con mutazione di *BRAF V600E* (OS mediana 62.0 versus 12.6 mesi; HR=0.36, 95% CI 0.20-0.64, P=0.002).¹⁹⁰

Infine, numerosi studi hanno dimostrato come l'aggiunta dei MoAbs anti-EGFR alla terapia nei *BRAF V600E* mutati non determini alcun beneficio in seconda o nelle successive linee, mentre i risultati sono meno chiari in prima linea.¹⁹¹⁻¹⁹³ Una recente metanalisi dimostra, appunto, un minimo impatto, sebbene non un effetto detrimentalmente, dall'aggiunta di un anticorpo anti-EGFR al trattamento standard nei pazienti *BRAF* mutati, sia in termini di OS (HR: 0.76; 95%CI 0.54-1.08; p=0.13), che di PFS (HR=0.86; 95%CI 0.63-1.17; p=0.34) e della RR (p=0.31).¹⁹³⁻¹⁹⁶

Allo stesso tempo un'altra metanalisi, effettuata da un gruppo australiano, ha preso in considerazione non solo i pazienti *BRAF* mutati arruolati in studi e randomizzati a più o meno anti-EGFR, ma anche i *BRAF* wt, ottenendo una p di interazione di 0.07, di poco superiore a quella statisticamente significativa dello 0.05, che non ci permette quindi formalmente di classificare la mutazione di *BRAF* come fattore predittivo negativo a questa terapia.¹⁹⁷ Andando però a valutare il beneficio clinico dell'aggiunta degli anti-EGFR in questi pazienti, è evidente come questo sia minimo, sia in termini di PFS che di OS.¹⁹⁶

Oltre a darci informazioni per quanto riguarda la prima linea, l'analisi di *BRAF* è utile anche nella gestione complessiva del paziente in tutto il suo percorso terapeutico.¹⁹⁸⁻²⁰⁰ Alcuni report evidenziano, infatti, come i pazienti *BRAF* mutati ricadano molto velocemente, dopo resezione di metastasi epatiche, soprattutto in altre sedi, andamento che evidenzia come sia una malattia micrometastatica probabilmente non candidata ottimale all'intervento chirurgico.²⁰¹⁻²⁰²

E' importante sottolineare come il laboratorio abbia cambiato nel tempo il modo in cui approcciarsi al tumore del colon-retto metastatico. Se prima del 2008 non vi era alcun fattore molecolare da poter applicare alla pratica e la somministrazione della terapia era basata esclusivamente su considerazioni di tipo clinico, successivamente, la scoperta della mutazione nell'esone 2 di *KRAS* nel 40% dei pazienti ha permesso di escludere questo gruppo dalla somministrazione di anticorpi monoclonali anti-EGFR. Cinque anni dopo, grazie alla validazione di preliminari evidenze retrospettive nell'analisi post-hoc di studi randomizzati, sono state individuate altre mutazioni a carico di *KRAS* e *NRAS* in circa 1/5 dei pazienti che prima venivano considerati come wt, per le quali valeva la stessa indicazione nei confronti di quei farmaci biologici. Risulta oggi fondamentale anche l'individuazione dei pazienti con mutazione a carico di *BRAF* V600E.

Al momento ci sono ampie prospettive per quanto riguarda farmaci biologici rivolti, sia direttamente contro *BRAF*, sia contro altre molecole. Gli inibitori di *BRAF*, singolarmente, non hanno dato nel mCRC risultati

entusiasmanti come nel melanoma.²⁰³ La spiegazione a questo fenomeno ci viene data da un recente studio che evidenzia come nel mCRC *BRAF* mutato ci possano essere piccole popolazioni alleliche anche *RAS* mutate per cui l'inibizione di *BRAF* porterebbe ad un'ulteriore iperattivazione di EGFR.²⁰⁴ Da questo presupposto si sono sviluppate strategie per bloccare non solo *BRAF*, ma anche EGFR con delle doppiette (*BRAF*i + EGFRi), che fino ad adesso non hanno però dato particolari risultati positivi²⁰⁵, o triplete (EGFRi, *BRAF*i e MEKi). Quest'ultime, da dati estremamente preliminari presentati da Atreya all'annual meeting dell'ASCO 2015 e da Elez al World Congress of Gastrointestinal Cancer 2015, sembrano poter apportare un certo beneficio.

Studi recentissimi hanno, inoltre, individuato che l'1-2% dei CRC e il 3% tra gli mCRC *RAS/RAF* wt ha mutazione di HER2, informazione che apre potenziali nuove possibilità di trattamento con farmaci anti-HER2.²⁰⁶⁻²⁰⁷

A questo si aggiungono evidenze di una sottopopolazione con ipermetilazione di MGMT, enzimi di riparazione del DNA, che sembra essere responsiva ad agenti alchilanti quali la dacarbazina o la temozolomide.²⁰⁸

Tra le novità presentate all'annuale meeting dell'ASCO 2015 anche l'instabilità dei microsatelliti, presente nel 5% del mCRC, ma in una percentuale maggiore, in proporzione, tra i mCRC *BRAF* mutati, sembra poter avere un riflesso anche dal punto di vista clinico. I tumori MSI-H, infatti, rappresentano forme con un numero molto elevato di mutazioni e, conseguentemente, di neoantigeni che richiamano in sede molti linfociti attivando, quindi, in modo consistente la risposta immunitaria del soggetto e indicandoci così un possibile percorso immunoterapico.²⁰⁹

2.2.1.2 Resecabilità chirurgica

La valutazione della resecabilità chirurgica permette la distinzione di tre gruppi di pazienti:

- “easily resectable” (15%), in cui le metastasi, solitamente confinate al fegato, sono al massimo 4, in cui i margini radiologici

sono adeguati per una resezione radicale e sono assenti fattori prognostici negativi maggiori;

- “borderline o marginally/potentially resectable” (35%), in cui sono presenti fattori prognostici negativi multipli e fattori di rischio per una breve DFS (come metastasi sincrone, malattia extraepatica, lesioni di grosse dimensioni, numero elevato, interessamento linfonodale del tumore primitivo, livelli elevati di CEA) e margini radiologici inadeguati. In questi casi l'intervento chirurgico non è tecnicamente eseguibile oppure potrebbe esserlo, ma in modo non radicale, cosicché la maggior parte di questi pazienti sarebbe destinata a recidivare in tempi brevi. Procedendo fin da subito con un trattamento medico possiamo indurre una riduzione volumetrica e numerica delle lesioni metastatiche e, solo successivamente, sottoporre il paziente all'intervento chirurgico. Identificare questo gruppo di pazienti è importante per la strategia terapeutica;
- “unresectable” (unlikely to become resectable) (50%), in cui la malattia è diffusa, non resecabile ed è improbabile che lo diventi anche in seguito a trattamento medico.

La resecabilità è un concetto moderno in questo ambito. Fino a pochi anni fa, infatti, la chemioterapia rappresentava l'unica possibilità terapeutica disponibile nei pazienti con tumore del colon-retto metastatico, mentre oggi è ampiamente riconosciuto il ruolo della chirurgia e di trattamenti locoregionali ablativi, trans-arteriosi (chemio- o radioterapici) o di altro tipo, con intento curativo, in pazienti selezionati. Lo scenario continua, inoltre, ad arricchirsi di nuove possibilità anche in ambito farmacologico, sia dal punto di vista chemioterapico, sia grazie a nuovi farmaci biologici a bersaglio molecolare o “target therapies”, quali soprattutto anticorpi monoclonali anti-EGFR, tra cui cetuximab e panitumumab, e anti-angiogenici, come il bevacizumab, spesso utilizzati in associazione ai farmaci citotossici convenzionali quali fluoropirimidine, oxaliplatino e irinotecan.

Una volta selezionati i pazienti dal punto di vista clinico, molecolare e della resecabilità, si può impostare la strategia ottimale per ognuno di essi. Come sopra riportato, al momento della diagnosi solo il 15% dei pazienti con malattia metastatica sono eleggibili fin da subito ad un approccio chirurgico con intento radicale.

Dopo resezione radicale i pazienti vivi dopo 5 anni variano dal 20 al 50% e, nei 2/3 dei casi, in questo arco di tempo si riscontrano recidive, di cui metà coinvolgono il fegato residuo. La spiegazione più probabile a questo alto tasso di recidive è la persistenza di malattia residua microscopica epatica in seguito alla chirurgia, per cui sembrerebbe trovare un razionale l'associazione alla chirurgia di una terapia medica. Ciò ha indotto l'interesse nell'uso della chemioterapia sistemica adiuvante allo scopo di ridurre questi tassi di recidiva, in modo simile a quella utilizzata nello stadio III della malattia. Nel 1990 due studi prospettici randomizzati (FCCD e ENG) hanno tentato di investigare il ruolo della chemioterapia adiuvante in questo ambito. In entrambi gli studi i pazienti, precedentemente sottoposti a resezione epatica, sono stati randomizzati a 5-fluorouracile/leucovorin (5-FU/LV) per 6 mesi versus osservazione. Purtroppo entrambi gli studi sono stati precocemente chiusi. I dati che ne sono stati ricavati dimostrano però un piccolo, ma statisticamente significativo, beneficio nel gruppo che ha ricevuto terapia adiuvante 5-FU/LV dopo resezione, sia in PFS (HR=1.39, IC 95% 1.04-1.85; p=0.026) che in OS (HR=1.39, IC 95% 1.00-1.93; p=0.046). Dal momento che non si è riusciti a studiare agenti sistemici più moderni come oxaliplatino, irinotecan e terapie mirate, il ruolo della chemioterapia adiuvante dopo resezione epatica di CRC metastatico è rimasta poco chiara per molti anni.²¹⁰ Successivamente, infatti, Ychou et al. hanno confrontato gli effetti di 12 cicli di terapia adiuvante con 5-FU/LV versus FOLFIRI (5-FU/LV e irinotecan) in pazienti già andati incontro a resezione completa di metastasi epatiche da CRC. Non vi era alcuna differenza significativa in DFS e OS, inoltre, la tossicità con il regime FOLFIRI era significativamente più elevata.²¹¹ Nella seconda metà degli anni 2000 è emerso, invece, un interesse nuovo nei confronti di una strategia peri-operatoria in pazienti con metastasi

epatiche resecabili, da CRC. Risultati pubblicati su Lancet Oncology dall'Organizzazione Europea per la Ricerca e la Cura del Cancro (EORTC), riguardo lo studio 4098 (EPOC), dimostrano come la combinazione di chemioterapia peri-operatoria (FOLFOX4) e chirurgia aumenti la sopravvivenza libera da progressione (PFS), rispetto alla sola chirurgia, in pazienti con metastasi epatiche da cancro coloretale ritenute resecabili all'imaging pre-operatorio. Viene riportato un vantaggio complessivo in PFS di 20.9 mesi per la chemioterapia peri-operatoria contro i 12.5 mesi della sola chirurgia (HR= 0.78; p=0.0035) con una differenza nella PFS a 3 anni del 7.3% (HR 0.79; 0.62–1.02; p=0.058) nei pazienti randomizzati, dell'8.1% (HR=0.77; 0.60–1.00; p=0.041) nei pazienti eleggibili per gli studi e del 9.2% (HR=0.73; 0.55–0.97; p=0.025) nei pazienti andati incontro a resezione secondaria. Nonostante un significativo miglioramento nella PFS, vi è stato un aumento dell'incidenza di complicanze post-chirurgiche in coloro che hanno ricevuto la chemioterapia peri-operatoria (25% vs 16%), anche se la mortalità è risultata simile in entrambi i gruppi (1%). Non sono state, inoltre, riscontrate differenze significative in termini di OS.²¹²⁻²¹³

Nell'articolo pubblicato di recente gli autori riportano i loro risultati a lungo termine: con un follow-up mediano di 8.5 anni dei 364 pazienti totali, 107 (59%) del gruppo della chemioterapia peri-operatoria, e 114 (63%) del gruppo della sola chirurgia, erano morti (HR=0.88; 95% CI 0.68-1.14; P=0.34). L'OS mediana è risultata maggiore nel gruppo a cui è stata somministrata anche la terapia medica, sia in tutti i pazienti (61.3 vs i 54.3 mesi; p=0.34), sia in quelli idonei a subire la resezione (63.7 mesi vs 55.0 mesi; P=0.30, sia in coloro che sono stati effettivamente sottoposti a chirurgia epatica (77.5 vs 73.3 mesi; P=0.35). Gli autori hanno anche riportato risultati a lungo termine della PFS mediana: 20.0 vs 12.5 mesi in tutti i pazienti randomizzati (p=0.068) e 20.9 vs 12.5 mesi in quelli eleggibili per la resezione (p=0.035), sempre a favore della chemioterapia peri-operatoria. Tra i pazienti che sono stati ritenuti idonei a subire la resezione, la PFS a 3 anni è risultata significativamente maggiore con l'uso di FOLFOX peri-operatorio rispetto alla sola chirurgia (36.2% vs 28.1%; HR=0.77, IC 95% 0.60-1.00; P=0.041). Dato

confermato anche nei pazienti che sono stati effettivamente sottoposti a resezione secondaria (42.4% vs 33.2%; HR=0.73, IC 95% 0.55-0.97; p=0.025). In totale, il 79% dei pazienti nel gruppo della chemioterapia ha completato tutti i 6 cicli pre-operatori, ma meno della metà di coloro che hanno ricevuto la terapia pre-operatoria ha ricevuto tutti i 6 cicli previsti nel post-operatorio.²¹⁴⁻²¹⁵ Dalla terapia peri-operatoria con FOLFOX4 sembrano trarne beneficio, in particolare, i pazienti con metastasi epatiche resecabili da CRC quando CEA è elevato e quando il PS non è alterato, indipendentemente dal numero di lesioni metastatiche.²¹⁶

In conclusione, lo studio EPOC è stato il primo studio prospettico randomizzato di confronto tra chemioterapia peri-operatoria e sola chirurgia per il trattamento delle metastasi epatiche resecabili da cancro al colon. Un ulteriore, più recente, aggiornamento conferma un significativo miglioramento nella sopravvivenza libera da progressione, ma non dimostra alcun beneficio significativo in OS, sebbene lo studio non fosse potenziato per evidenziare una differenza significativa.²¹⁷

Allo scopo di verificare se la risposta immunitaria nelle metastasi epatiche coloretali sia legata alla sopravvivenza libera da progressione (PFS) e se quindi essa possa essere influenzata dalla terapia sistemica, è stata eseguita un'analisi retrospettiva dello studio 40983 dell'EORTC. Sono stati analizzati il tessuto tumorale e i profili di risposta immunitaria di 82 pazienti tra quelli sottoposti a resezione, 38 nel braccio della chemioterapia perioperatoria e 44 nel braccio della sola chirurgia. Un elevato numero di linfociti CD3 + e mastociti è stato correlato con il grado di regressione del tumore (TRG). Una PFS prolungata si associava alla presenza di mastociti nel tumore (9.8 vs 16.5 mesi; HR= 0.54; p=0.03), ad un elevato numero di linfociti CD3+ ai margini della neoplasia (10.8 vs 22.8 mesi; HR=0.57; p=0.03) e ad uno score delle cellule T > 2 (10.8 vs 38.6 mesi; HR=0.51, p=0.04), fattori che risultano quindi essere prognostici positivi.²¹⁸

Complessivamente, i risultati dello studio dell'EORTC 40983 hanno portato la comunità oncologia medica e chirurgica ad utilizzare la terapia peri-operatoria soprattutto in pazienti con metastasi epatiche da CRC potenzialmente resecabili, più frequentemente che in quelli con malattia

fin da subito easily resectable. Questa tendenza clinica è forse dovuta alla preoccupazione per un aumento delle complicanze chirurgiche dovuto all'uso della chemioterapia pre-operatoria e alla mancanza di un provato netto suo beneficio in termini di OS. Nella maggior parte dei casi, quindi, i pazienti con metastasi epatiche easily resectable vengono prima operati e poi sottoposti a un trattamento farmacologico post-operatorio. Si evita così il rischio di tossicità pre-chirurgica e quindi di potenziale successiva inoperabilità, oltre che quello di un'eventuale progressione in corso di trattamento medico. Nel caso esistano fattori prognostici negativi si può preferire un trattamento sistemico peri-operatorio.

Attualmente, quindi, nonostante la chirurgia rimanga l'unico trattamento potenzialmente curativo per le metastasi epatiche resecabili, la sua integrazione con un trattamento sistemico può fornire un ulteriore beneficio. Nel tempo approcci di gestione multimodale e tecniche chirurgiche innovative hanno, inoltre, completamente trasformato il trattamento e la prognosi di questi pazienti.

Il percorso terapeutico va personalizzato e quindi modificato in base al singolo paziente: la chemioterapia peri-operatoria sarà ad esempio controindicata in caso di secondarismi epatici di piccole dimensioni, in quanto essa può aumentare il rischio di ridurre ulteriormente il volume delle lesioni, rendendole non più visibili, senza che questo corrisponda, nella maggior parte dei casi, alla loro reale eliminazione, ma riducendo così le possibilità di un'eradicazione chirurgica. Allo stesso modo, in caso di recidiva dopo breve tempo dall'interruzione di un trattamento chemioterapico adiuvante, sarà probabile che una nuova chemioterapia pre-chirurgica determini uno scarso beneficio e ritardi irrimediabilmente la resezione.

Gli schemi prevalentemente utilizzati si basano su fluoropirimidine e oxaliplatino (FOLFOX oXELOX per 6 mesi o 3+3).

In questo setting non c'è indicazione all'uso di terapie target. Farmaci come cetuximab sono controindicati in aggiunta a CT peri-operatoria perché hanno un effetto detrimentalmente (PFS: 20.5 mesi nella CT da sola vs 14.1 mesi se aggiungiamo cetuximab; HR=1.48; p=0.03).²¹⁹

Nei pazienti con malattia potenzialmente resecabile si sceglie di iniziare sempre con un trattamento sistemico impegnativo, ovviamente in modo compatibile con le condizioni cliniche del paziente. Quando possibile viene somministrata una combinazione di 2 o 3 farmaci citotossici e farmaci biologici, utilizzando nel singolo paziente il trattamento che fornisce le migliori chance di riuscire a ridurre il volume della malattia, per poi, dopo alcuni mesi, poter ricorrere alla chirurgia. La risposta massima solitamente si ottiene nell'arco di 2-4 mesi.

Una review di 10 anni fa, comprendente tutti gli studi clinici retrospettivi e prospettici pubblicati e i dati presentati ai meetings internazionali (ASCO, ESMO, ECCO) fino ad allora, dimostrò come ci sia una chiara correlazione fra il tasso di risposta oggettiva e quello di resezione, in pazienti con metastasi localizzate soltanto al fegato che avevano eseguito chemioterapia di induzione ($P=0.002$).²²⁰

La sopravvivenza globale a 5 anni nei pazienti con resezione macroscopicamente completa delle metastasi coloretali, in seguito a chemioterapia di induzione, risulta paragonabile a quella di pazienti con metastasi epatiche fin da subito resecabili, ovvero 50% (95% CI 33-68%) vs 28-39%.²²¹⁻²²⁵

Questi risultati sono considerati come la base di un cambiamento paradigmatico da trattamento palliativo a curativo nei pazienti con metastasi limitate al fegato. Se si utilizzano schemi terapeutici altamente attivi in pazienti accuratamente selezionati si può ipotizzare un tasso di risposta simile al 70%, con un tasso di resezione di circa il 50%.²²⁶⁻²²⁸

Nel contesto della terapia pre-operatoria la questione chiave rimane quella di chiarire quale dei regimi di trattamento attualmente disponibili possa essere considerato ottimale. Regimi infusionali basati su 5-FU e oxaliplatino (FOLFOX) o irinotecan (FOLFIRI) determinano tassi di risposta attorno al 50% a cui corrispondono tassi di resezioni secondarie del 10% circa.

In uno studio randomizzato, confrontando FOLFIRI e FOLFOX6²²⁹, entrambi i regimi hanno dato un tasso di risposta del 55% circa. Tra i pazienti arruolati, 24 di coloro che erano stati trattati con FOLFOX6 e

solo 10 tra quelli del braccio con FOLFIRI erano eleggibili per la resezione secondaria di metastasi ($P=0.03$), ma il numero di resezioni R0 non differiva in modo significativo, con 14 pazienti nel braccio FOLFOX e 8 pazienti nel braccio FOLFIRI (58% vs 80% dei pazienti sottoposti a resezione, rispettivamente)^{221,230}.

Sebbene non ci sia altro confronto testa a testa di FOLFOX e FOLFIRI in questo ambito, non sembra tanto lo specifico farmaco scelto ad essere importante, quanto l'intensità del regime complessivo.

Tra i trattamenti disponibili c'è anche la tripletta FOLFOXIRI (acido folinico, 5-fluorouracile, oxaliplatino e irinotecan) che risulta determinare un miglioramento del tasso di risposta dal 34% (con FOLFIRI) al 60% ($p<0.0001$), del tasso di resezione complessiva dal 6% al 15% ($p=0.033$), ma soprattutto a livello epatico (dal 12% al 36%; $p=0.017$). La PFS mediana aumenta con la tripletta da 6.9 mesi a 9.9 mesi ($p=0.0009$) e l'OS da 16.7 mesi a 23.6 ($p=0.042$).²³¹

Considerando nello specifico i pazienti che, in seguito a conversione con terapia sistemica (FOLFOXIRI), sono andati incontro a resezione radicale (R0), si rileva una OS mediana di 40.8 mesi con il 42% dei pazienti vivi a 5 anni e il 33% a 8 anni.²³²

Altra opzione terapeutica prevede, in pazienti *RAS/RAF* wild type (vd. Paragrafo "fattori clinici e molecolari"), trattamenti che comprendono MoAbs anti-EGFR. Sulla base dei risultati di studi di fase II, il cetuximab sembra aumentare in modo importante l'efficacia dell'oxaliplatino²²⁷ e dei regimi di associazione a base di irinotecan, che si traduce in alti tassi di risposta alla terapia di induzione. Quando cetuximab è stato combinato con un'infusione di 5-FU/LV e irinotecan, cinque dei 19 pazienti totali sono stati convertiti a resezione secondaria.²²⁸ In un altro studio 599 pazienti hanno ricevuto FOLFIRI più cetuximab o soltanto FOLFIRI. L'HR per la PFS tra i pazienti con *KRAS* wt era 0.68 (95% CI 0.50-0.94) in favore del gruppo FOLFIRI più cetuximab. Le reazioni avverse di grado 3-4 sono state più frequenti nel gruppo trattato anche con cetuximab: reazioni cutanee (nel 19.7% vs. 0.2% dei pazienti; $P<0.001$), reazioni

infusione-correlate (nel 2.5% vs 0%; $P < 0.001$) e diarrea (nel 15.7% vs 10.5%, $P = 0.008$).²³³

Uno studio cinese ha randomizzato 138 pazienti con metastasi sincrone non resecabili limitate al fegato *KRAS* wt, in seguito a chirurgia su tumore primitivo, a ricevere chemioterapia (FOLFIRI o mFOLFOX6) più cetuximab (braccio A) o da sola (braccio B). L'obiettivo primario era il tasso di conversione alla chirurgia, tra i secondari c'erano il tasso di risposta e la sopravvivenza. In seguito alla valutazione della resecabilità da parte di un team multidisciplinare, 20 su 70 pazienti nel braccio A e 9 su 68 nel braccio B erano candidabili all'intervento chirurgico. Il tasso di resezione R0 delle metastasi epatiche è stato del 25.7% (18 di 70 pazienti) nel primo gruppo e del 7.4% (5 di 68 pazienti) nel secondo gruppo, differenza significativa ($P < 0.01$). I pazienti a cui è stato somministrato anche cetuximab hanno avuto un tasso di risposte obiettive del 57.1% vs 29.4% ($P < 0.01$), una maggior OS (OS mediana 30.9 vs 21 mesi; $p = 0.013$) e una maggior PFS (PFS mediana 10.2 vs 5.8 mesi; $p = 0.004$) rispetto al gruppo della sola chemioterapia.²³⁴

In un setting di conversione ha spazio anche un altro farmaco biologico, il bevacizumab, anticorpo monoclonale anti-VEGF ad effetto anti-angiogenico, in grado di aumentare l'attività della chemioterapia citotossica e i tassi di risposta di circa il 10%. Tuttavia, in un ampio studio di fase III l'associazione di bevacizumab alla chemioterapia pre-operatoria ha determinato un sanguinamento post-chirurgico o un'alterata guarigione della ferita in 5 su 59 pazienti, evento assente nei pazienti non trattati con il farmaco biologico. Anche se questa differenza non era significativa ($p = 0.12$), ulteriori indagini dimostrano come l'uso del bevacizumab in questo setting debba essere effettuato con cautela. Il numero di pazienti con complicanze di questo tipo si riduceva a 3 su 215 se l'intervallo di tempo tra la conclusione della terapia sistemica e l'intervento era di almeno 28 giorni.²³⁵ Sulla base di questa osservazione e a causa dell'emivita di bevacizumab (circa 42 giorni), è attualmente consigliabile eseguire un'operazione chirurgica, se possibile, almeno 4-6 settimane dopo la somministrazione di questo farmaco.

Un lavoro recente ha associato bevacizumab alla tripletta FOLFOXIRI dimostrando un tasso di risposta dell'81% (95% CI 65-91) nel caso di FOLFOXIRI e bevacizumab e del 62% (95% CI 45-77) nel caso di mFOLFOX-6 e bevacizumab ($p=0.061$), mentre il tasso di resezione era rispettivamente del 61% (95% CI 45-76) e del 49% (95% CI 32-65). Il tasso di resezioni R0 passava, inoltre, dal 23% al 49% ($p=0.017$). La PFS mediana era 18.6 mesi (95% CI 12.9-22.3) nel gruppo trattato con tripletta e 11.5 mesi (95% CI 9.6-13.6) nell'altro (HR=0.43; 95% CI 0.26–0.72). Gli eventi avversi di grado 3-4 si sono riscontrati con maggior frequenza con FOLFOXIRI rispetto a mFOLFOX-6 (neutropenia 50% vs 35%, diarrea 30% vs 14%).²³⁶

In generale, la resezione di metastasi epatiche in seguito a trattamento di conversione, è una procedura sicura. Con l'uso di un regime come FOLFOX o XELOX, Gruenberger e colleghi hanno riportato una mortalità peri-operatoria dello 0% in 50 pazienti.²³⁷ In ulteriori studi, su 138 pazienti trattati con oxaliplatino²³⁸ e su 57 pazienti trattati con FOLFIRI²³⁹, è stata riportata una mortalità perioperatoria dello 0.7-1.7%. Questo si confronta favorevolmente con la mortalità peri-operatoria del 2.8-4%^{222-223,225} riportata in una serie più ampia di pazienti con metastasi epatiche inizialmente non resecabili. In assenza di altri studi randomizzati, questi dati suggeriscono che il tipo di chemioterapia (oxaliplatino o irinotecan-based) non influenza la mortalità peri-operatoria.

In conclusione, la resezione secondaria dopo chemioterapia nei pazienti inizialmente non resecabili offre una possibilità di cura. La selezione dei pazienti è critica così come la corretta definizione di non resecabilità iniziale. Fondamentale risulta la scelta di regimi molto attivi.

Nel gruppo dei pazienti con malattia metastatica da tumore del colon-retto di tipo potentially/marginally o borderline resectable è quindi necessario un approccio iniziale attivo con terapia sistemica di conversione quale doppietta più anti-EGFR (solo nei pazienti con malattia *RAS* e *BRAF* wild-type) o tripletta più bevacizumab. Successivamente è opportuno rivalutare il paziente ogni 2-3 mesi e proseguire con l'intervento chirurgico se una resezione R0 sembra poter

essere raggiunta. In seguito verrà considerato un eventuale trattamento sistemico post-chirurgico o una terapia multidisciplinare di salvataggio in caso di recidiva (>80% dei casi).

Tra i pazienti con malattia diffusa, soltanto alcuni, grazie all'ottima risposta alla terapia, vengono reconsiderati per la chirurgia, ma si tratta comunque di casi relativamente rari. In questi pazienti, infatti, si tende ad applicare generalmente una strategia palliativa, atta a migliorarne quantità e qualità di vita.

Complessivamente, nell'ambito della terapia del tumore del colon-retto metastatico, essendo le possibilità terapeutiche attuali numerosissime, affinché venga fatta la scelta ottimale in ogni singolo caso, è fondamentale selezionare fin da subito i pazienti distinguendo coloro che verranno trattati con scopo curativo (ovvero i casi in cui si intravede la possibilità di una resezione radicale delle localizzazioni secondarie) e coloro in cui, invece, sarà possibile soltanto un intervento palliativo.

Nel contesto di una terapia curativa è necessario ottenere fin dall'inizio del trattamento un ottimo controllo della malattia, dal momento che l'approccio terapeutico iniziale è fondamentale nel condizionare la prognosi degli stessi pazienti e nel rendere possibili ed efficaci ulteriori successivi trattamenti. La chemioterapia di prima linea risulta, quindi, essere il principale determinante dell'outcome del paziente, avendo un ruolo cruciale nell'interrompere la progressione della malattia e nel determinare una riduzione della sintomatologia quando presente, oltre al fatto che per alcuni rappresenta l'unica possibilità di cura, se opportunamente coordinata con interventi locoregionali.

In caso, invece, di una terapia palliativa, maggiore è il numero di farmaci che viene somministrato nell'arco di tutto il percorso terapeutico e maggiore è la sopravvivenza del paziente stesso. È' necessario, quindi, quando possibile, esporre il paziente a tutti i farmaci potenzialmente attivi, sia citotossici, sia biologici, cercando di garantire un continuum of care allo scopo di migliorare la qualità della vita (Quality of Life, QoL) e aumentare la sopravvivenza (OS). In particolare, un'ampia review

pubblicata nel 2004²⁴⁰ dal JCO e validata l'anno successivo²⁴¹ con i dati di ulteriori 4 studi di fase III²⁴²⁻²⁴⁵ ha correlato in modo significativo ($P=0.0001$) l'esposizione ai tre farmaci citotossici disponibili (5-fluorouracile, irinotecan, oxaliplatino) con l'OS in questi pazienti. Nell'analizzare questi dati è opportuno comunque tener presente che parte del vantaggio clinico nei pazienti che ricevono più linee di trattamento è dovuto alle caratteristiche della malattia stessa, che si presenta più indolente o, comunque, più responsiva ai trattamenti rispetto ai casi in cui si ha la possibilità di somministrare soltanto la prima linea.

Grazie al maggior utilizzo di tecniche diverse dalla chemioterapia, in combinazione con essa, e grazie al suo continuo miglioramento, la prognosi dei pazienti con malattia metastatica da CRC è indubbiamente migliorata nell'arco degli ultimi anni. I pazienti non trattati con chemioterapia, in passato, avevano una sopravvivenza mediana di 5 mesi, quasi la metà rispetto a coloro che ricevevano 5-FU ($p=0.0006$).²⁴⁶ Una review retrospettiva di 2740 pazienti con mCRC trattati in prima linea al M. D. Anderson Cancer Center e alla Mayo Clinic ha evidenziato come la sopravvivenza generale mediana sia passata dai 14.2 mesi, di coloro la cui diagnosi era stata fatta tra il 1990 e il 1997, ai 29.3 mesi se fatta dal 2004 al 2006. Allo stesso modo, la sopravvivenza a 5 anni è aumentata dal 9.1% degli anni '90 al 19.2% del 2001-2003.²⁴⁷ Attualmente, questi pazienti possono vivere anche alcuni anni e una quota di essi può addirittura guarire dal tumore metastatico.²⁰⁰

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

Al momento, il passo cruciale nel processo decisionale della terapia di prima linea del mCRC è rappresentato dalla scelta della "miglior intensità della chemioterapia" oltre che del "miglior biologico" tra quelli disponibili.

2.2.2 Scelta del trattamento farmacologico nella malattia non resecabile

2.2.2.1 Scelta dell'intensità

Per quanto riguarda la scelta dell'intensità della chemioterapia di prima linea, la combinazione di una doppietta e un biologico viene ritenuta un'opzione standard e quindi più idonea per la maggior parte dei pazienti.²⁴⁸

Tuttavia, studi pubblicati recentemente esplorano l'efficacia dei farmaci biologici anche in associazione a monochemioterapia²⁴⁹ e a triplette^{250,200}, ovvero a una più ampia gamma di opzioni chemioterapiche.

Terapia con doppiette

I farmaci citotossici fluoropirimidine, oxaliplatino e irinotecan rappresentano il cardine della terapia dei pazienti affetti da mCRC.

In seguito alla sua introduzione nel 1957 da parte di Heidelberger et al.²⁵¹⁻²⁵², il 5-FU è stato a lungo l'unico farmaco disponibile in questo stadio, utilizzato quindi in monoterapia e studiato in numerose schedule e modalità di somministrazione.²⁵³⁻²⁵⁴

Negli anni altre possibilità terapeutiche, nell'ambito dei farmaci citotossici, si sono affiancate al 5-FU, grazie all'introduzione di irinotecan e oxaliplatino, testati prima all'interno di doppiette in associazione al 5-FU (FOLFIRI²⁵⁵⁻²⁵⁶ e FOLFOX²⁵⁷⁻²⁵⁸ e, successivamente, come tripletta, in maniera concomitante (FOLFOXIRI).^{259,200} Vari studi hanno, inoltre, verificato la possibilità di sostituire il 5-FU, somministrato per via infusione, con un suo precursore orale appartenente anch'esso alle fluoropirimidine, la capecitabina. Questo farmaco può essere utilizzato da solo, in monoterapia, o come doppietta insieme all'oxaliplatino.²⁶⁰⁻²⁶³ L'associazione con irinotecan determina un potenziamento della diarrea, tossicità dose limitante di entrambi i farmaci, e pertanto non viene comunemente utilizzata.

La combinazione di 5-FU e irinotecan in prima linea è stata valutata in uno studio in cui 683 pazienti sono stati randomizzati a ricevere

irinotecan, 5-FU e leucovorin (FOLFIRI; n=231), 5-FU e leucovorin (5-FU/LV; n=226) o solo irinotecan in monoterapia (n=226). Gli obiettivi primari erano la PFS e la OS. La PFS mediana nel primo gruppo (FOLFIRI) è risultata significativamente maggiore rispetto a 5FU/LV (7.0 vs. 4.3 mesi; HR=0.64; p=0.004) così come l'OS mediana (14.8 vs 12.6 mesi; HR=0.78; p=0.04), con risultati simili al gruppo 5-FU/LV nel caso del solo irinotecan.

In termini di eventi avversi il trattamento con FOLFIRI incrementava gli episodi di diarrea di grado 3, mentre l'incidenza di quelli di grado 4 risultava essere simile nei vari gruppi (<8%).²⁵⁵

Questi primi risultati sono stati confermati da un altro studio che ha coinvolto 387 pazienti non trattati precedentemente con chemioterapia, randomizzati a ricevere FOLFIRI (n=199) o 5-FU/LV (n=188) con schedule settimanali o bisettimanali. Gli obiettivi primari erano RR e PFS. La RR è risultata significativamente maggiore nei pazienti trattati anche con irinotecan (49 vs 31%; p<0.001 nei pazienti valutabili), così come la PFS mediana (6.7 vs 4.4 mesi; p<0.001) e l'OS mediana (17.4 vs 14.1 mesi; p=0.031) rispetto al gruppo trattato con 5-FU/LV. Alcune tra le tossicità di grado 3 e 4 erano significativamente più frequenti nel gruppo con irinotecan, ma i loro effetti risultavano prevedibili, reversibili, non cumulativi e facilmente gestibili dal punto di vista clinico.²⁵⁶

Allo stesso modo vari trials clinici hanno studiato un'altra doppietta: FOLFOX (5-FU, LV, oxaliplatino). Uno di essi ha randomizzato 200 pazienti da 15 centri in quattro diversi Paesi a ricevere 5-FU/LV con o senza oxaliplatino, con lo scopo di valutare primariamente la RR. Una risposta obiettiva è stata rilevata nel 16% dei pazienti che avevano ricevuto 5-FU/LV (95% CI 9-24%), rispetto al 53% di coloro a cui era stata somministrata la doppietta (95% CI 42-63%) (P<0.001). L'aggiunta dell'oxaliplatino, inoltre, aumentava la PFS mediana da 6.1 mesi (4.1-7.4 mesi) a 8.7 mesi (7.4-9.2 mesi) (P=0.048). Nel braccio della doppietta si assiste però a maggiori tossicità, poiché il 43% circa dei pazienti ha sviluppato una diarrea di grado 3 e/o 4 e il 13% ha avuto neuropatia periferica di grado 2.²⁵⁷

A sostegno di questi risultati è stato pubblicato un altro studio che ha arruolato 400 pazienti, non trattati precedentemente con chemioterapia, anche essi randomizzati a ricevere 5-FU/LV da solo o associato ad oxaliplatino. La PFS mediana, che era l'end point primario, è stata significativamente maggiore nel braccio trattato anche con oxaliplatino rispetto all'altro (9.0 vs 6.2 mesi; $P=0.0003$) e migliore è risultata anche la RR (50.7% vs 22.3%; $P=0.0001$). Le tossicità di grado 3-4 sono state maggiori nel gruppo dell'oxaliplatino sia in termini di neutropenia (41.7% vs 5.3% dei pazienti) sia in termini di diarrea (11.9% vs 5.3%) e di neurotossicità periferica (grado 3: 18.2% vs 0%), ma questo non si ripercuote in un peggioramento della qualità di vita (QoL).²⁵⁸

Successivamente alla registrazione dei due regimi FOLFIRI e FOLFOX da parte della FDA, rispettivamente nel 2000 e nel 2003, nuovi studi pubblicati hanno confrontato le due associazioni di farmaci.^{229,264}

Il primo è uno studio di fase III che confronta un primo braccio (n=109) a cui viene somministrato FOLFIRI e, a progressione, FOLFOX (FOLFOX6) e un altro in cui invece il FOLFOX6 precede il FOLFIRI (n=111). L'OS mediana era di 21.5 mesi nel gruppo trattato prima con FOLFIRI e poi con FOLFOX6 e di 20.6 mesi nell'altro ($P=0.99$). La PFS mediana, invece, di 14.2 vs 10.9 mesi ($P=0.64$). Tossicità di grado 3-4 come la mucosite, la nausea e il vomito e di grado 2 come l'alopecia, erano più frequenti con il FOLFIRI in prima linea, mentre la neutropenia e la neurotossicità di grado 3-4 erano più frequenti iniziando con FOLFOX6.²²⁹

Successivamente, uno studio di fase III eseguito dal GOIM (Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale) ha valutato l'efficacia della terapia in prima linea con regime FOLFIRI (braccio A) vs FOLFOX4 (braccio B) in 360 pazienti con carcinoma coloretale metastatico. Non sono state segnalate differenze significative nell'ORR (31% nel braccio A; 95% CI 24.6-38.3% vs 34% nel braccio B; 95% CI 27.2-41.5%; $P=0.60$), nel tempo medio alla progressione (TTP) (7 vs 7 mesi), nella durata della risposta (9 vs 10 mesi) e nell'OS (14 vs 15 mesi). Le tossicità si sono rivelate in entrambi i casi moderate, con alopecia e disturbi

gastrointestinali più frequenti nel braccio A e trombocitopenia e neurotossicità più frequenti nel braccio B.²⁶⁴ Questi dati testimoniano complessivamente la sostanziale equiefficacia delle due sequenze, con i diversi e ben noti profili di tossicità dei farmaci di volta in volta utilizzati.

Nell'ambito della terapia di prima linea del mCRC si sono approfondite l'efficacia e la sicurezza di un'altra fluoropirimidina, oltre al 5-FU, la capecitabina, farmaco a somministrazione orale. Il primo studio ha randomizzato 602 pazienti a ricevere capecitabina o 5FU/LV e ha raggiunto il suo obiettivo primario ovvero la dimostrazione di un'equivalente RR nei due gruppi di trattamento. La capecitabina ha, infatti, dimostrato un'efficacia equivalente oltre ad una maggiore maneggevolezza e alla praticità della somministrazione orale. L'ORR era del 18.9% per la capecitabina e del 15.0% per il 5-FU/LV, il tempo mediano alla progressione 5.2 vs 4.7 mesi (P=0.65), il tempo mediano al fallimento terapeutico 4.2 vs 4.0 mesi (P=0.89) e l'OS mediana 13.2 vs 12.1 mesi (P=0.33). I profili di tossicità riflettevano in entrambi i casi quello tipico delle fluoropirimidine; la terapia con capecitabina determinava un numero significativamente inferiore (P<0.00001) di stomatite, alopecia e neutropenia e allo stesso tempo superiore di hand-foot syndrome e aumento della bilirubina (P <0.00001).²⁶⁰

Successivamente, una metanalisi ha valutato sei studi randomizzati di fase II e III di confronto tra la terapia con oxaliplatino in combinazione con la capecitabina orale (XELOX) o con il 5-FU infusionale (FOLFOX) nel mCRC. Essa coinvolge un totale di 3.494 pazienti (FU, n=1.737; XELODA, n=1.757) analizzati in termini di RR, PFS, OS e tossicità. Complessivamente la RR è risultata maggiore per i regimi a base di 5-FU (HR=0.85; 95% CI 0.74-0.97; P=0.02), anche se questo non si ripercuote sulla PFS (HR=1.04; 95% CI 0.96-1.12; P=0.17) e sull'OS (HR=1.04; 95% CI 0.95-1.12; P=0.41). I profili di tossicità risultano essere diversi: tossicità di grado 3-4 come la trombocitopenia (HR=2.07, 95% CI 1.42-3.03; P<0.0002) e la diarrea (HR=1.34; 95% CI 1.08-1.66; P<0.0009) e di grado 2-3 come l'hand-foot syndrome (HR=3.54; 95% CI 2.07-6.05; P<0.00001) sono meno frequenti se utilizzato 5-FU, mentre la

neutropenia (HR=0.15; 95% CI 0.11-0.19; P<0.00001) è minore con la capecitabina.²⁶¹

I dati supportano quindi la possibilità di scegliere lo schema XELOX in questo setting.

La capecitabina è stata inoltre valutata in associazione con irinotecan in due studi. Il primo ha arruolato soltanto 85 pazienti dei 629 pianificati a causa della morte di 8 di essi non correlata alla progressione della malattia, che sono stati doppiamente randomizzati a ricevere FOLFIRI o XELIRI e placebo o celecoxib. Le RR sono state del 22% per XELIRI+celecoxib, del 48% per XELIRI+placebo, del 32% per FOLFIRI+celecoxib e del 46% per FOLFIRI+placebo. La PFS mediana e l'OS mediana erano invece ridotte per XELIRI rispetto a FOLFIRI (PFS 5.9 vs 9.6 mesi e OS 14.8 vs 19.9 mesi) e per celecoxib rispetto al placebo (PFS 6.9 vs 7.8 mesi e OS 18.3 vs 19.9 mesi). Nonostante i dati siano a favore di FOLFIRI, dato il ridotto numero di pazienti, non possono essere tratte conclusioni definitive sulla non-inferiorità di XELIRI nei confronti di FOLFIRI.²⁶²

Un ulteriore studio di fase III ha cercato di fare chiarezza a riguardo tramite un confronto tra tre regimi in cui l'irinotecan è stato associato a capecitabina (XELIRI), a 5FU/LV infusione (FOLFIRI) e a 5FU/LV in bolo (mIFL). Sono stati trattati in prima linea 430 pazienti randomizzati a ricevere i tre diversi trattamenti e anche, come nel precedente studio, a ricevere celecoxib o placebo. L'end point primario era la PFS, i secondari OS, RR e il profilo di tossicità. La PFS mediana era 7.6 mesi per FOLFIRI, 5.9 mesi per mIFL (P=0.004) e 5.8 mesi per XELIRI (P=0.015), mentre l'OS mediana era 23.1 mesi per FOLFIRI, 17.6 mesi per mIFL (P=0.09) e 18.9 mesi per XELIRI (P=0.27). Il trattamento con XELIRI è stato, inoltre, associato ad una maggior frequenza di vomito, diarrea e disidratazione di grado severo. Da questo studio emerge, quindi, come FOLFIRI offra un'attività superiore allo XELIRI e un profilo tossico paragonabile, che esclude l'associazione di capecitabina e irinotecan dalle possibilità di trattamento in prima linea del mCRC. Un regime infusione a base di 5FU/LV è inoltre da preferire rispetto alla somministrazione in bolo.²⁶³

Sulla base di questi studi è possibile affermare che i regimi FOLFOX, XELOX e FOLFIRI sono equivalenti in termini di efficacia, mentre hanno un profilo di tossicità peculiare, per cui la scelta della doppietta deve essere effettuata sulla base di questioni pratiche, delle caratteristiche e delle preferenze del paziente.

Una terapia di prima linea a base di irinotecan (FOLFIRI) potrebbe essere preferita in pazienti che abbiano precedentemente ricevuto un trattamento adiuvante con oxaliplatino o in caso di alto rischio di neuropatia periferica, mentre una combinazione con oxaliplatino e capecitabina (XELOX) potrebbe essere preferibile per evitare l'impianto del catetere venoso centrale e per ridurre la frequenza dei cicli di trattamento (trisettimanali anziché bisettimanali). Infine, sia XELOX che FOLFOX potrebbero essere opzioni da preferire per i pazienti con compromissione della funzionalità epatica basale o con la sindrome di Gilbert (per il loro elevato rischio di neutropenia con irinotecan), ad alto rischio di diarrea o per coloro che in precedenza abbiano subito una colectomia totale o subtotale, controindicazione assoluta alla somministrazione di irinotecan.

Terapia con tripletta

Già prima dell'era delle terapie target, l'esposizione dei pazienti con mCRC ai tre citotossici attivi (fluoropirimidine, oxaliplatino e irinotecan) era stata correlata ad una più lunga sopravvivenza e quindi ad una miglior prognosi.^{229,240} Allo stesso tempo, studi preclinici e precoci studi clinici hanno dimostrato un effetto sinergico tra fluorouracile, oxaliplatino e irinotecan.^{259,265-266}

Questi dati supportavano lo sviluppo di regimi a base di FOLFOXIRI per la terapia di prima linea nei pazienti con mCRC. Sono stati quindi condotti vari studi di fase I e II per valutare l'attività e il profilo di sicurezza della combinazione di 5-FU, irinotecan e oxaliplatino (FOLFOXIRI) in questo setting.^{259,267} La combinazione dei tre farmaci è stata confrontata con FOLFIRI in due studi di fase III randomizzati dal

Gruppo Oncologico del Nord-Ovest (GONO) e del gruppo Hellenic Oncology Research (HORG).^{231,268}

Lo studio del GONO²³¹ aveva come endpoint primario il tasso di risposte. Le risposte si sono rivelate nei due bracci, FOLFIRI e FOLFOXIRI, rispettivamente del 6% e dell'8% (complete) e del 35% e 58% (parziali) (RR: 41% vs 66%; P=0.0002). Il numero di resezioni R0 secondarie alla terapia è stato maggiore nel braccio con FOLFOXIRI (6% vs 15%; P=0.033, tra tutti e 244 i pazienti, e 12% vs 36%; P=0.017 tra i pazienti con metastasi soltanto epatiche). La PFS e l'OS erano anch'esse significativamente più lunghe con FOLFOXIRI (PFS mediana: 6.9 vs 9.8 mesi; HR=0.63; 95% CI 0.47-0.81, P=0.0006; OS mediana: 16.7 vs 22.6 mesi; HR=0.70; 95% CI 0.50-0.96, P=0.032). La tripletta incrementava alcune tossicità, si sono riscontrate più frequentemente, infatti, neurotossicità periferica di grado 2 e 3 (0% vs 19%; P<0.001) e neutropenia di grado 3 e 4 (28% vs 50%; P<0.001), mentre l'incidenza della neutropenia febbrile (3% vs 5%) e della diarrea di grado 3 e 4 (12% vs 20%) non era significativamente differente. Il profilo di tossicità risultava, tuttavia, nel complesso accettabile.

In conclusione, sulla base di questi risultati, possiamo affermare che FOLFOXIRI in prima linea incrementa la RR, la PFS, e la OS rispetto al FOLFIRI, causando un incremento, comunque maneggevole, di alcune tossicità.

Differentemente, lo studio HORG²⁶⁸ non ha dimostrato un significativo beneficio in favore della tripletta.

La discrepanza nei risultati dei due studi può essere attribuita ad un paio di punti cruciali, che incidono negativamente sulla tollerabilità del trattamento e sulla sicurezza nello studio HORG. In primo luogo va considerata la schedula di trattamento adottata nello studio HORG che prevedeva la somministrazione di 5-FU in bolo e dosi più basse di oxaliplatino e irinotecan, rispetto a quelle utilizzate nello studio GONO e, in secondo luogo, il fatto che lo studio greco abbia arruolato una popolazione più anziana e con ECOG Performance Status non ottimale. Tuttavia, l'analisi combinata dei trials di GONO e HORG ha evidenziato un vantaggio significativo con l'aggiunta dell'oxaliplatino alla terapia di

prima linea con FOLFIRI sia in termini di PFS (HR=0.73; 95% CI 0.55-0.95), che di OS (HR=0.79; 95% CI 0.63-0.98).²⁶⁹

Monochemioterapia

In un'epoca in cui si va sempre più verso un'intensificazione della terapia di prima linea nel paziente con mCRC, un trattamento con fluoropirimidine orali in monoterapia può trovare ancora spazio.

Nell'era precedente alle terapie target studi di fase III randomizzati hanno studiato il ruolo potenziale di strategie terapeutiche sequenziali, utilizzando fluoropirimidine in monoterapia, rispetto a strategie di combinazione (doppiette), in prima linea.²⁷⁰⁻²⁷² Il razionale alla base di queste ipotesi era rappresentato soprattutto dalla possibilità di limitare gli eventi avversi, migliorando così la qualità della vita del paziente, rispetto a regimi di associazione, senza comprometterne la sopravvivenza.

Nello studio FOCUS²⁷⁰, 2135 pazienti sono stati randomizzati a ricevere 5-FU seguito da irinotecan in monoterapia (strategia A), 5-FU iniziale seguito da trattamento di combinazione con irinotecan o oxaliplatino (strategia B) e trattamento di combinazione iniziale con irinotecan o oxaliplatino (strategia C). L'endpoint primario era la sopravvivenza e solo i pazienti trattati con la strategia C, contenente irinotecan, hanno mostrato una migliore OS rispetto a coloro che erano parte della strategia A (HR=0.84, 95% CI 0.73-0.96; p=0.01), mentre non sono state riportate differenze tra gli altri bracci dello studio.

Nello studio CAIRO²⁷¹, 820 pazienti sono stati randomizzati a ricevere prima la capecitabina, seguita da irinotecan e, successivamente, da XELOX (strategia sequenziale) oppure prima XELIRI e in seguito XELOX (strategia di combinazione). L'endpoint primario era la sopravvivenza. La strategia di combinazione non ha migliorato in modo significativo l'OS rispetto alla strategia sequenziale (17.4 vs 16.3 mesi; HR=0.92, 95% CI 0.79-1.08; p=0.33).

Nello studio FFCD 2000-05²⁷², 410 di 570 pazienti inizialmente previsti sono stati randomizzati a ricevere terapia sequenziale (prima linea 5-FU, seconda linea FOLFOX e terza linea FOLFIRI) o di combinazione (prima

linea FOLFOX e seconda linea FOLFIRI). Lo studio è stato interrotto prematuramente a causa della lentezza nel reclutamento dei pazienti. L'endpoint primario, che era la PFS dopo due linee di trattamento, è risultata essere 10.5 mesi (95% CI 9.6-11.5) nel gruppo della terapia sequenziale e 10.3 mesi (9.0-11.9) nel gruppo della terapia di combinazione (HR= 0.95, 95% CI 0.77-1.16; p=0.61.)

Sebbene questi risultati sembrano indicare la non-inferiorità degli approcci sequenziali rispetto alla combinazione upfront, essi devono essere cautamente interpretati. Prima di tutto, come previsto, RR e PFS sono state migliori nel braccio di combinazione, il che dimostra la necessità di adottare un approccio combinato quando è richiesta una risposta obiettiva. In secondo luogo, come sottolineato da O'Neil e Goldberg,²⁷³ gli studi FOCUS e CAIRO dimostrano un piccolo e non statisticamente significativo beneficio in termini di OS per la terapia di combinazione, comunque ridotta (13.9-17.4 mesi) rispetto all'OS mediana rilevata dagli altri studi di prima linea condotti negli stessi anni. Una possibile spiegazione risiede nel fatto che siano stati selezionati pazienti con PS non ottimale (quelli a cui comunque il clinico sarebbe stato in dubbio sull'opportunità di offrire un trattamento di prima linea di combinazione) e a peggior prognosi. A tutto ciò si aggiunge il fatto che, mentre una minor incidenza di eventi avversi è stata registrata nella prima linea per i trattamenti sequenziali, complessivamente, considerando tutte le linee, non sono state riportate differenze significative tra le due strategie, neanche in termini di qualità della vita.

Le strategie sequenziali sono ad oggi raccomandate dalle linee guida nei pazienti non resecabili, in assenza di sintomatologia tumore-correlata e in caso di ridotto rischio di rapido deterioramento clinico, nei casi in cui l'obiettivo del trattamento sia quello di ritardare la progressione della malattia e di prolungare la vita del paziente.²⁴⁸ Tuttavia, nella pratica clinica quotidiana, l'identificazione "a priori" di pazienti con queste caratteristiche è molto difficile e quindi una strategia sequenziale viene adottata raramente a causa dell'elevato rischio di non raggiungere un adeguato controllo della malattia.

Sulla base di queste osservazioni l'uso della monoterapia può risultare una scelta obbligata da riservare soltanto a pazienti non idonei per le combinazioni a causa delle loro comorbidità e/o della loro età o con controindicazioni specifiche per gli altri farmaci citotossici.²⁷⁴

2.2.2.2 Scelta del miglior farmaco biologico

Negli ultimi anni le crescenti conoscenze nell'ambito dei meccanismi biomolecolari alla base della trasformazione e progressione tumorale hanno permesso di mettere a punto farmaci a bersaglio molecolare. Nel trattamento del mCRC vengono attualmente utilizzate, principalmente, due classi di farmaci tra cui ricade, quindi, la scelta del "miglior biologico": farmaci anti-angiogenici, in particolar modo il bevacizumab, anticorpo monoclonale anti-fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), e gli anticorpi monoclonali anti-EGFR, come il cetuximab e il panitumumab.

Farmaci anti-angiogenici

L'angiogenesi è definita come un complesso processo multistep che consiste nella neoformazione di vasi sanguigni attraverso lo sviluppo di nuovi capillari formati dalla scissione o dalla gemmazione dei vasi già esistenti. Nell'adulto l'angiogenesi fisiologica è continua, sebbene a regimi molto ridotti ed è associata fondamentalmente al mantenimento del sistema vascolare, al ciclo mestruale nella donna e ai processi di cicatrizzazione. Essa diventa essenziale nel momento in cui si sviluppa una neoplasia e ne costituisce un elemento critico sia nella crescita del primitivo, che nella conseguente capacità di formare metastasi.²⁷⁵ Nel 1971, Judah Folkman ha per primo individuato l'angiogenesi tumorale come possibile bersaglio della terapia antitumorale.²⁷⁶ Sia l'angiogenesi fisiologica che quella tumorale sono regolate dal microambiente tumorale dell'ospite per mezzo di fattori di crescita, in parte altamente specifici per le cellule endoteliali, come il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) e in parte a più ampio spettro d'azione, come il basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) e le Matrix MetalloProteinases (MMPs).²⁷⁷⁻²⁷⁸ Il principale

fattore pro-angiogenico, nonché promotore chiave nell'angiogenesi e quindi della progressione tumorale, è il VEGFA (VEGF), una glicoproteina omodimerica diffusibile prodotta da cellule sane e neoplastiche. Essa fa parte della famiglia del VEGF-PDGF (Platelet Derived Growth Factor), che comprende altri elementi tra cui sia PIGF (Placental Growth Factor), sia VEGFB, VEGFC, VEGFD e VEGFE, tutte molecole che mostrano un'analogia strutturale con VEGF e sono determinate da un meccanismo di splicing alternativo dello stesso gene.²⁷⁹⁻²⁸¹ I ligandi VEGF mediano i loro effetti angiogenici principalmente attraverso tre diversi recettori di membrana cellulare: VEGFR-1, -2 e -3.²⁸²⁻²⁸³ Questi recettori sono costituiti da un dominio extracellulare, un dominio transmembrana e un dominio tirosin-chinasico intracellulare. Il legame del ligando al recettore induce l'attivazione di vie di trasduzione del segnale intracellulare coinvolte nella regolazione della proliferazione e della sopravvivenza cellulare, come ad esempio quelle mediate da RAF/MEK, mTOR e PI3K. I vari ligandi hanno diverse specificità recettoriali, il VEGF lega VEGFR-1 con affinità maggiore, ma si ritiene che esso agisca inizialmente da "recettore esca" modulando la disponibilità del VEGF al VEGFR-2, che rappresenta il recettore principale. L'espressione del gene VEGF è regolata da vari stimoli, quali estrogeni e ossido nitrico (NO), l'ipossia e numerosi altri fattori di crescita (FGF4, PDGF, TNF-alfa, EGF, TGF-beta, IL-6, IL-1-beta).

In molti tumori umani si osserva una sovraregolazione e una sovraespressione del VEGF e dei suoi recettori e diversi studi hanno dimostrato che elevati livelli di VEGF correlano con maggiore densità microvascolare, maggiore incidenza di metastasi, diminuito indice apoptotico e ridotta OS in pazienti con CRC.²⁸⁴⁻²⁸⁶

Dal momento che VEGF e i suoi recettori svolgono un ruolo critico nella angiogenesi e nella progressione tumorale è stato avviato un complesso progetto focalizzato sullo sviluppo di agenti che inibiscono specificamente questa via. Diversi modelli preclinici hanno dimostrato che gli anticorpi monoclonali diretti contro VEGF inibiscono la crescita tumorale nei topi.²⁸⁷⁻²⁸⁸ Da questi presupposti sono stati sviluppati farmaci anti-angiogenici il cui panorama è oggi estremamente ampio. Le

diverse strategie comprendono anticorpi monoclonali che inibiscono in modo specifico il ligando (VEGF o altri membri della stessa famiglia) o il recettore (VEGFR), sul versante esterno, e altre molecole che vanno ad agire, invece, a livello dei domini intracellulari tirosin-chinasi del recettore stesso. Tra i farmaci anti-VEGF ritroviamo il bevacizumab, anticorpo monoclonale ricombinante, umanizzato, ad attività selettiva nei confronti di VEGFA, e l'affibercept, proteina ricombinante di fusione costituita dal dominio extracellulare di VEGFR, capace di legare non solo VEGFA, ma anche VEGFB e il Placental Growth Factor (PlGF), la cui efficacia in seconda linea, in associazione alla chemioterapia, è stata testata nello studio di fase III VELOUR.²⁸⁹

Sono, invece, MoAbs diretti contro il dominio extracellulare del recettore, farmaci come il ramucirumab, che lega il VEGFR-2, studiato sia in prima linea che nelle successive nel mCRC.²⁹⁰⁻²⁹² Infine, tra i numerosi farmaci inibitori tirosin-chinasi del VEGFR, può essere utilizzato nel mCRC il regorafenib, molecola ad ampia attività su numerosi recettori tra i quali VEGFR, PDGFR, RAF, c-KIT, studiata in particolar modo nelle linee di trattamento successive alla prima.²⁹³

Il primo farmaco a bersaglio molecolare ad essere stato studiato nei pazienti con mCRC è stato il bevacizumab, la cui efficacia è stata provata in associazione a tutte le intensità di trattamento chemioterapico^{198,200,243,263,294-302} (monoterapia, doppiette e tripletta), sia in prima sia nelle linee successive³⁰³⁻³⁰⁴, ma anche nella sua prosecuzione o reintroduzione in combinazione alla chemioterapia di seconda linea nei pazienti progrediti dopo la precedente somministrazione.³⁰⁵

L'associazione di bevacizumab a doppiette di chemioterapici è stata valutata in numerosi studi, uno dei quali, lo studio registrativo, ha randomizzato pazienti con mCRC precedentemente non trattati, a ricevere irinotecan e 5-FU (schema IFL) più bevacizumab o IFL più placebo. Paragonato a IFL da solo, l'aggiunta di bevacizumab aumentava la PFS mediana da 6.2 a 10.6 mesi (HR=0.64; p<0.001),

l'ORR dal 34.8% al 44.8% ($p=0.004$) e l'OS mediana, obiettivo primario dello studio, da 15.6 a 20.3 mesi ($HR=0.66$; $p<0.001$). Le tossicità tipiche della chemioterapia non risultavano significativamente aumentate, ma allo stesso tempo comparivano eventi avversi caratteristici del bevacizumab, quali ipertensione arteriosa, proteinuria, sanguinamento, aumento dell'incidenza di episodi di tromboembolia venosa e arteriosa, perforazioni gastrointestinali e ritardo nella riparazione e guarigione delle ferite.²⁴³

Sulla base di questi risultati promettenti, bevacizumab nel 2004 è stato registrato dall'FDA per il trattamento in prima linea del mCRC.

In un secondo momento il farmaco è stato testato anche in associazione a FOLFIRI.²⁹⁵⁻²⁹⁸

Nello studio BICC-C²⁶³ pazienti con mCRC precedentemente non trattati sono stati randomizzati a ricevere 5FU/LV infusione più irinotecan (FOLFIRI), regime IFL modificato in bolo (mIFL) o capecitabina più irinotecan (XELIRI) e anche a ricevere celecoxib o placebo. Dopo l'approvazione del bevacizumab, da parte della Food and Drug Administration nel trattamento di prima linea del mCRC, esso è stato aggiunto al protocollo. Dati presentati all'ASCO 2007 hanno dimostrato che FOLFIRI più bevacizumab determinava una PFS mediana di 11.2 mesi, la sopravvivenza ad un anno dell'87% e un'OS mediana di 28 mesi, maggiore rispetto a quella con mIFL più bevacizumab (19.2 mesi; $p=0.037$). Tuttavia la validità di questi risultati è limitata dal piccolo gruppo di pazienti coinvolti (57 trattati con FOLFIRI più bevacizumab).

Un successivo studio (AVIRI)²⁹⁷ di fase IV sull'associazione FOLFIRI/bevacizumab in prima linea, comprendente 209 pazienti, offre però una conferma a questi dati, risultando la PFS mediana di 11.1 mesi (95% CI 10.3–12.1 mesi), la sopravvivenza ad un anno dell'82% (95% CI 77–87%) e l'OS mediana 22.2 mesi (95% CI 20.5–25.9 mesi).²⁹⁸

Nell'ambito delle doppiette chemioterapiche, bevacizumab è stato studiato anche in associazione a FOLFOX e XELOX, in prima linea.

Lo studio TREE-2²⁹⁹ ha randomizzato 213 pazienti con mCRC a ricevere bevacizumab e uno di tre differenti regimi contenenti oxaliplatino e 5-FU

(mFOLFOX6, bFOL, XELOX). Il bevacizumab aumentava in modo significativo le RR di tutti i regimi, con una OS mediana complessiva di 23.7 mesi. Questo dato appare estremamente favorevole se confrontato con l'OS mediana di 18.2 mesi dello studio TREE-1, che non prevedeva il bevacizumab.

Un altro ampio studio di fase III³⁰⁰ ha randomizzato 1401 pazienti con mCRC a XELOX o FOLFOX4 e anche a bevacizumab o placebo, dimostrando una PFS mediana, obiettivo primario dello studio, di 9.4 mesi nel gruppo con bevacizumab e di 8.0 mesi nel braccio con placebo (HR=0.83; 97.5% CI 0.72-0.95; p=0.0023). L'OS mediana era di 21.3 mesi nel gruppo del bevacizumab vs 19.9 mesi nel gruppo del 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 però interpretati in seguito ad opportune considerazioni: nonostante il protocollo raccomandasse di proseguire l'anticorpo fino alla progressione, infatti, la maggior parte dei pazienti ha sospeso il bevacizumab dopo 6 mesi. Nel gruppo di pazienti che lo ha proseguito fino a progressione è stato riscontrato un ulteriore guadagno in PFS, rispetto a chi ha sospeso precocemente la terapia.

Alla luce di tutti questi risultati il bevacizumab può essere somministrato in prima linea nel trattamento del mCRC sia in associazione a FOLFIRI che a FOLFOX/XELOX.

La sicurezza e l'attività del bevacizumab sono state valutate anche in associazione alla tripletta FOLFOXIRI, dal GONO, nello studio di fase II FOIB¹⁹⁸, su 57 pazienti. Da esso emergono risultati estremamente positivi in termini di RR (77%) e di controllo della malattia (100%) con un profilo di tossicità chemioterapia-correlato non incrementato. Sulla base di queste incoraggianti premesse lo stesso GONO ha eseguito lo studio multicentrico di fase III TRIBE²⁰⁰, su 508 pazienti provenienti da 34 unità oncologiche italiane, allo scopo di confrontare FOLFOXIRI più bevacizumab con FOLFIRI più bevacizumab nei mCRC non resecabili. I pazienti ricevevano 12 cicli di trattamento di induzione e, successivamente, mantenimento con 5-FU e bevacizumab, fino alla

progressione. La tripletta più bevacizumab ha dimostrato incrementare in modo significativo la PFS, obiettivo primario, rispetto al FOLFIRI più bevacizumab (12.1 vs 9.7 mesi, HR=0.75; 95% CI 0.62-0.90; p=0.003), ma anche la RR (65% vs 53%; OR=1.64; 95% CI 1.15-2.35; p=0.006) e l'OS mediana ad un follow-up di 48.1 mesi (29.8 vs 25.8 mesi; HR=0.80, 95% CI 0.65-0.98; p=0.030). L'OS stimata a 5 anni arriva addirittura a raddoppiare quella di FOLFIRI/bevacizumab (24.9% vs 12.4%). L'intensificazione del trattamento è stata associata ad un aumento significativo degli eventi avversi di grado 3 e 4, come la neurotossicità (5.2% vs 0%), stomatiti (8.8% vs 4.3%), diarrea (18.8% vs 10.6%) e neutropenia (50.0% vs 20.5%), ma non sono state osservate differenze per quanto riguarda la neutropenia febbrile e nessuna morte trattamento-correlata è stata riportata.²³¹ Oltretutto è importante sottolineare come l'efficacia di bevacizumab sia indipendente dallo stato mutazionale di *RAS* e *BRAF*, poiché risultata efficace in tutti i sottogruppi molecolari.²⁰⁰ Tuttavia, al fine di adottare correttamente questo regime nella pratica clinica di routine, i pazienti candidati dovrebbero essere selezionati secondo specifici criteri di inclusione:^{198,250} pazienti di età superiore ai 75 anni non dovrebbero essere esposti a questo regime, così come quelli tra 70 e 75 anni con ECOG PS > 0. Inoltre, i pazienti precedentemente esposti ad un trattamento adiuvante a base di oxaliplatino non sono i candidati ottimali per la tripletta.

Nonostante questi risultati estremamente incoraggianti, rimangono diverse questioni aperte riguardo l'associazione di FOLFOXIRI e bevacizumab come la durata del trattamento, il mantenimento e le strategie di trattamento successive alla prima linea, per cui ci sono numerosi studi a riguardo in corso (OPAL³⁰⁶, QUATTRO³⁰⁷, CHARTA³⁰⁸, MOMA³⁰⁹, TRIBE-2³¹⁰).

L'efficacia e il profilo di tossicità del bevacizumab sono stati testati, oltre che in associazione a regimi chemioterapici di combinazione, con monoterapie. Nel tumore del colon-retto metastatico, in uno studio randomizzato di fase II³⁰¹, sono stati somministrati due diversi dosaggi di bevacizumab in combinazione con 5-FU/LV. Sia la bassa, sia l'alta dose

del farmaco biologico hanno dimostrato incrementare significativamente l'efficacia della terapia, se confrontata a quella con soltanto 5-FU/LV, con una RR del 40% (95% CI 24-58%) e del 24% (95% CI 12-43%), nei regimi con, rispettivamente, basse e alte dosi di bevacizumab, e del 17% (95% CI 7-34%) con la sola chemioterapia. Inoltre, il tempo mediano alla progressione era maggiore in entrambi i bracci con bevacizumab, ovvero 9.0 mesi (95% CI 5.8-10.9 mesi) con basse dosi, 7.2 mesi (95% CI 3.8-9.2 mesi) con alte dosi e 5.2 mesi (95% CI 3.5-5.6 mesi) con 5-FU/LV. L'OS mediana è risultata anch'essa ridotta nel braccio di controllo (13.8 mesi; 95% CI 9.1-23.0 mesi) rispetto agli altri due, a bassa dose (21.5 mesi; 95% CI 17.3-indeterminato) e ad alta dose (16.1 mesi; 95% CI 11.0-20.7 mesi). Tra gli eventi avversi è importante sottolineare la frequenza con cui si è riscontrato sanguinamento gastrointestinale o trombosi, ovvero 0%, 0.6% e 16% per il primo e 9%, 26% e 13% per la seconda, rispettivamente nei bracci trattati con solo 5-FU/LV, 5-FU/LV più 5 mg/kg di bevacizumab e 5-FU/LV più 10 mg/kg di bevacizumab. Altre tossicità determinate dal farmaco biologico sono state ipertensione, proteinuria ed epistassi.

Questi risultati incoraggianti hanno offerto uno spunto per successivi studi, tra cui quello dello stesso gruppo di Kabbinar³⁰² su 209 pazienti mCRC che sono stati randomizzati a ricevere 5-FU/LV più placebo o 5-FU/LV più bevacizumab in prima linea di trattamento. La particolare selezione dei pazienti ha incluso coloro che non erano stati considerati candidati ottimali alla terapia con doppietta a base di irinotecan. L'OS mediana, end point primario, è stata di 16.6 mesi per il gruppo 5-FU+bevacizumab e 12.9 mesi per il gruppo 5-FU+placebo (HR=0.79; p=0.16), mentre la PFS mediana ha raggiunto i 9.2 mesi nel primo braccio e i 5.5 mesi nel secondo (HR=0.50; p=0.0002). La RR era rispettivamente del 26.0% e del 15.2% (p=0.055). Ipertensione di grado 3 è stata registrata più frequentemente nel braccio trattato con bevacizumab, ma essa è risultata controllabile attraverso farmaci orali e non ha causato un'interruzione del trattamento (16% vs 3%).

Tutto questo ha dimostrato come l'aggiunta di questo farmaco biologico alla terapia con 5-FU/LV di prima linea del mCRC, in pazienti non

candidati ottimali per la terapia con chemioterapia di combinazione, determini un beneficio significativo anche in termini di OS e PFS.

Successivamente, uno studio di fase III (AVEX)³¹¹ ha dimostrato l'efficacia dell'associazione di bevacizumab e capecitabina, anche in questo caso in pazienti con mCRC non resecabile non candidati al trattamento con doppietta o in pazienti con più di 70 anni (età media 76 anni tra i pazienti randomizzati). L'aggiunta di bevacizumab incrementava la PFS, obiettivo primario dello studio (9.1 vs 5.1 mesi; HR=0.53; 95% CI 0.41-0.69; p<0.0001), e la RR (19% vs 10%; p=0.04). La frequenza di eventi avversi di grado 3, correlati al bevacizumab e alla chemioterapia, è risultata simile tra i gruppi di trattamento, con l'eccezione di eventi tromboembolici venosi e hand-foot syndrome, che si sono verificati più spesso nel braccio sperimentale.

In conclusione, la scelta di una monochemioterapia in prima linea dovrebbe essere per lo più riservata ai pazienti non idonei per le combinazioni. In assenza di controindicazioni specifiche, l'associazione di capecitabina con il bevacizumab rappresenta un'opzione standard quando è richiesto un regime di bassa intensità, soprattutto per i pazienti anziani, grazie alla sua efficacia e al suo profilo di tossicità limitato.

Farmaci anti-EGFR

Gli anticorpi monoclonali anti-EGFR sono farmaci studiati dapprima in linee avanzate di trattamento e, successivamente, anche in prima linea.²³³

La loro efficacia è stata dimostrata in particolar modo in associazione alle doppiette chemioterapiche, mentre poco chiaro è il loro ruolo assieme alla tripletta FOLFOXIRI e nella terapia di mantenimento.

Van Cutsem et al.^{164,233} hanno randomizzato, in uno studio di fase III, un totale di 1198 pazienti a ricevere FOLFIRI con o senza cetuximab, così da investigare l'efficacia e il profilo di sicurezza dell'aggiunta del farmaco biologico anti-EGFR alla chemioterapia standard. Nei pazienti con tumore *KRAS* wild-type, che erano stati trattati con cetuximab più

FOLFIRI, si è osservato un vantaggio statisticamente significativo sia in termini di Progression Free Survival (PFS mediana 9.9 vs 8.4 mesi; HR=0.696; P=0.0012), obiettivo primario dello studio, sia in termini di Overall Survival (OS mediana 23.5 vs 20.0 mesi; HR=0.796; p=0.0093), rispetto a coloro che avevano ricevuto soltanto FOLFIRI. Anche in termini di Response Rate l'aggiunta del farmaco biologico determinava un incremento dal 39.7% al 57.3% (OR=2.069; P<0.001), con un conseguente aumento della quota di metastasectomie epatiche con intento curativo e di resezioni radicali (R0) (7.9% vs 4.6%; OR=1.823; 95% CI 0.957-3.472; P=0.0633 e 5.1% vs 2.0%; OR=2.650; 95% CI 1.083-6.490; P=0.0265, rispettivamente). La comparsa precoce di rash cutaneo in alcuni dei pazienti *RAS* wt trattati con cetuximab (n=207) è stata associata ad una maggior sopravvivenza (OS mediana 26.4 vs 19.1 mesi), se confrontata con coloro che non avevano sviluppato tossicità di questo tipo (n=101). Nei casi in cui erano presenti mutazioni a carico di *KRAS* non si è riscontrato un beneficio nell'aggiunta di cetuximab in termini di OS, PFS e RR e, complessivamente, la loro prognosi è stata peggiore, in entrambi i bracci dello studio.

L'analisi mutazionale e l'individuazione di sottogruppi su base molecolare ha, quindi, permesso di confermare come questi benefici siano strettamente correlati allo stato di *KRAS*, con valore predittivo negativo delle mutazioni a suo carico. Allo stesso modo la mutazione di *BRAF* V600E ha influenzato negativamente la prognosi di quei pazienti e il vantaggio nell'aggiunta del cetuximab al FOLFIRI non ha raggiunto la significatività statistica (PFS mediana: 8.0 vs 5.6 mesi; HR=0.934; P=0.87; OS mediana: 14.1 vs 10.3 mesi; HR=0.908; P=0.74). Per quanto riguarda il profilo di tossicità, l'evento avverso di grado 3-4 più frequente è stata la neutropenia (28.2% vs 24.9% a favore del gruppo con FOLFIRI e cetuximab) e, come atteso, anche la diarrea (15.7% vs 10.5%; P=0.008), le reazioni cutanee (di grado 3: 19.7% vs 0.2%; P<0.001) e quelle correlate all'infusione (2.5% vs 0%; P<0.001) sono state maggiori nel braccio comprendente cetuximab.

Nel complesso la terapia di combinazione è comunque risultata ben tollerata.

Lo studio di fase II randomizzato OPUS¹⁶⁵ ha valutato l'attività di cetuximab in combinazione con FOLFOX4 (n=169) versus FOLFOX4 da solo (n=168) nel trattamento di prima linea del mCRC. L'aggiunta del cetuximab alla chemioterapia ha dimostrato aumentare la RR (46% vs 36%; $p=0.064$) e la quota di resezioni R0 (4.7% vs 2.4%), sebbene in modo non statisticamente significativo. In termini di PFS, inoltre, non sono stati registrati benefici con cetuximab più FOLFOX4. Suddividendo, però, anche in questo caso, i pazienti in base allo stato mutazionale di *KRAS*, i pazienti *KRAS* wild-type andavano incontro, se trattati con cetuximab e FOLFOX4, ad un aumento delle risposte (57% versus 34%; $OR=2.551$; $P=0.0027$) e ad una riduzione del rischio di progressione del 43% (PFS mediana 8.3 versus 7.2 mesi; $HR=0.567$; $P=0.0064$), rispetto a coloro che ricevevano solo FOLFOX4. La differenza in OS tra i due bracci, benché a favore dell'utilizzo del cetuximab, non era statisticamente significativa (OS mediana 22.8 versus 18.5 mesi; $HR=0.855$, $P=0.39$). L'effetto risulta addirittura detrimentalmente nei pazienti *KRAS* mutati, con una riduzione del tasso di risposta (34% versus 53%; $OR=0.459$; $P=0.0290$) e un maggior rischio di progressione (PFS mediana 5.5 versus 8.6 mesi; $HR=1.720$, $P=0.0153$) in coloro che ricevevano anche cetuximab, così come una minor OS, anche se non in modo statisticamente significativo (17.5 versus 13.4 mesi; $HR=1.290$, $P=0.20$).

La combinazione è stata ben tollerata e gli eventi avversi di grado 3-4 più frequenti sono stati, anche questa volta, in linea con il ben noto profilo di tossicità degli anti-EGFR. Reazioni cutanee (come xerosi, eritema, dermatite acneiforme, prurito ed esfoliazione cutanea) sono state osservate nel 18% dei pazienti con cetuximab più FOLFOX4 (versus 0.6% del gruppo con solo FOLFOX4), reazioni infusione-correlate nel 5% versus 2%, neutropenia nel 30% versus 34% e diarrea di grado 3 nell'8% versus 7%.

Lo studio COIN³¹² è stato creato per verificare la non-inferiorità in termini di efficacia della chemioterapia intermittente, rispetto a quella continua, e per studiare il beneficio apportato dall'aggiunta di cetuximab alla chemioterapia a base di oxaliplatino.

I pazienti erano stati randomizzati a ricevere soltanto chemioterapia in modo continuativo (oxaliplatino e fluoropirimidine) (arm A), chemioterapia continua e cetuximab (arm B) o chemioterapia intermittente (arm C). Benché i risultati dello studio non dimostrino una non-inferiorità della terapia intermittente (arm C) rispetto a quella continua (arm A) in termini di OS mediana (14.4 vs 15.8 mesi nella popolazione ITT; HR=1.084; 80% CI 1.008-1.165), quest'ultima può comunque costituire un'opzione per alcuni pazienti. Essa può determinare, infatti, un aumento degli intervalli liberi dal trattamento, una riduzione degli effetti tossici cumulativi e un miglioramento della qualità di vita. Le analisi dei sottogruppi suggeriscono che i pazienti con una normale conta piastrinica basale potrebbero ottenere i benefici della chemioterapia intermittente senza che questo corrisponda ad una riduzione nella loro sopravvivenza, mentre quelli con conta piastrinica basale aumentata avrebbero, con la chemioterapia intermittente, una ridotta sopravvivenza e una peggior qualità di vita, tanto che non dovrebbero ricevere questo tipo di trattamento.

I risultati riguardo il profilo di sicurezza confermano che l'aggiunta dell'anti-EGFR alla chemioterapia determina un aumento gestibile delle tossicità, soprattutto in termini di rash cutaneo di grado 3 e 4 (12% e 10% versus 0% e 1%, con o senza cetuximab in aggiunta alla chemioterapia; $p < 0.001$), diarrea (25% vs 15%; $p = 0.005$), nausea/vomito (14% vs 7%; $p = 0.012$), ipomagnesemia (4-9% vs 2-3%; $p < 0.05$) e letargia (17-21% vs 7-8%; $p < 0.001$).

Sulla base e a completamento di quest'ultimo, lo studio di fase II multicentrico e randomizzato COIN-B³¹³ ha coinvolto 30 ospedali in UK e uno a Cipro, arruolando pazienti con mCRC che non avevano ancora ricevuto alcun trattamento chemioterapico e assegnandoli (1:1) a chemioterapia intermittente più cetuximab intermittente o continuo. Pazienti di entrambi i gruppi ricevevano FOLFOX e cetuximab per 12

settimane e, successivamente, veniva pianificato un mantenimento con cetuximab (cetuximab continuo) o il trattamento, quindi anche il cetuximab, veniva interrotto. La Failure-Free Survival a 10 mesi, end point primario dello studio, era del 50% con cetuximab intermittente e del 52% con cetuximab continuo: FFS mediana di 12.2 mesi (95% CI 8.8-15.6) versus 14.3 mesi (10.7-20.4), rispettivamente, con un profilo di tossicità analogo a quello che solitamente caratterizza questi farmaci.

Vale et al.¹⁶⁸ hanno pubblicato nel 2012 una metanalisi su migliaia di pazienti di qualsiasi età, con CRC in fase avanzata, facenti parte di dieci studi controllati e randomizzati (RCTs) accomunati dalla randomizzazione a trattamenti standard in associazione o meno a un anti-EGFR (cetuximab, panitumumab). Valutando prima e seconda linea di trattamento: in pazienti con tumori *KRAS* wt l'aggiunta del farmaco biologico era associata a maggiore PFS (HR=0.83; 95% CI 0.76-0.90 su sei RCTs), OS (HR=0.89; 95% CI 0.82-0.97; su sei RCTs) e Best Overall Response (OR= 1.77; 95% CI 1.52-2.06; su sei RCTs) rispetto alle terapie standard. Nei pazienti con mutazioni di *KRAS* non ci sono state differenze in PFS (HR=1.06; 95% CI 0.96-1.17; su sei RCTs), in OS (HR=1.04; 95% CI 0.95-1.15; su sei RCTs) e in Best Overall Response (OR=1.19; 95% CI 0.99-1.43) tra i due gruppi di trattamento.

Come già emerso precedentemente, mutazioni a carico di *RAS* hanno valore predittivo negativo nei confronti della risposta agli MoAbs anti-EGFR ed escludono l'utilizzo di cetuximab e panitumumab. Da questo deriva, infatti, la scelta del bevacizumab, in associazione ad una doppietta di chemioterapici, come opzione standard di trattamento nei pazienti *RAS* mutati.²⁴⁸ Nei pazienti *RAS* wild type, invece, negli ultimi anni, la scelta tra MoAbs anti-EGFR e il bevacizumab è diventata un'importante questione di dibattito che non si è conclusa con la presentazione dei risultati di tre ampi studi: FIRE-3, PEAK e CALGB/SWOG 80405.³¹⁴⁻³¹⁹

Lo studio di fase III FIRE-3³¹⁴ ha randomizzato 592 pazienti con mCRC wt per l'esone 2 di *KRAS* a ricevere una prima linea di trattamento con FOLFIRI più cetuximab (braccio A) o con FOLFIRI più bevacizumab (braccio B). Sia il tasso di risposte, obiettivo primario dello studio, sia la PFS non hanno mostrato differenze significative nei due bracci di trattamento (RR 62.0% vs 58.0%; OR=1.18; 95% CI 0.85-1.64; p=0.18 e PFS mediana 10.0 vs 10.3 mesi; HR=1.06; 95% CI 0.88-1.26; p=0.55 nel braccio con cetuximab e in quello con bevacizumab, rispettivamente). Da questi si differenziano i risultati in termini di OS, a favore del gruppo con cetuximab (OS mediana 28.7 vs 25.0 mesi; HR=0.77; 95% CI 0.62-0.96; p=0.017). I profili di sicurezza sono risultati in linea con quanto conosciuto sugli eventi avversi correlati ai farmaci utilizzati. Le tossicità di grado 3 o maggiore, in entrambi i gruppi di trattamento, sono state la pancitopenia (73 casi ovvero il 25% di 297 pazienti trattati con cetuximab e 62, quindi il 21% dei 295 trattati con bevacizumab), le reazioni cutanee (77.26% vs 6.2%) e la diarrea (34.11% vs 40.14%). E' stata successivamente condotta un'analisi sul sottogruppo di pazienti *RAS* wt, quelli cioè che non presentavano mutazioni a carico degli esoni 2, 3 e 4 di *KRAS* e *NRAS* e nei quali è oggi possibile utilizzare gli anticorpi anti-EGFR. Si confermano risultati analoghi in termini di RR e PFS (RR: OR=1.28; 95% CI 0.83-1.99; p=0.32; PFS: HR=0.93; 95% CI 0.74-1.17; p=0.54) e allo stesso tempo si accentua la differenza in termini di OS in favore di cetuximab (33.1 vs 25.6 mesi; HR=0.70; 95% CI 0.53-0.92; p=0.011). Su un gruppo di pazienti selezionato, solo il 56% dei 592 totali, è stato possibile eseguire ulteriori indagini di tipo radiologico analizzando altri due parametri oltre ai criteri RECIST, ovvero l'ETS (Early Tumor Shrinkage), definito come la riduzione di almeno il 20% nel diametro delle lesioni target dopo 6 settimane dall'inizio della terapia, e la DoR (Deepness of Response), definita come la percentuale di massima riduzione dei diametri massimi delle lesioni target al nadir, confrontati con i valori basali. Sia le risposte obiettive secondo i criteri RECIST (72.2% vs 63.1%; p=0.017), sia i parametri radiologici ETS e DoR erano aumentati nel braccio con cetuximab ed erano significativamente correlati con una maggior PFS e OS mediane in entrambi i bracci. Dal

momento che la DoR è risultata essere maggiore con cetuximab, questo potrebbe spiegare il vantaggio in OS in questo braccio, in quanto ottenere una maggiore riduzione del volume tumorale potrebbe tradursi in una progressione più precoce (in quanto è minore in termini assoluti l'incremento da registrare per raggiungere il 20% che definisce la progressione stessa) e con minor carico di malattia, in grado quindi di impattare favorevolmente sulla sopravvivenza globale. Tuttavia i risultati sono complessivamente molto difficili da interpretare dato che esiste una forte e significativa correlazione anche tra la DoR e la PFS, che farebbe vacillare almeno la prima parte di questa spiegazione.³¹⁵

Lo studio di fase II PEAK³¹⁷ ha invece randomizzato 285 pazienti wt per l'esone 2 di *KRAS* a ricevere bevacizumab o panitumumab, in combinazione con FOLFOX (mFOLFOX6). I risultati sono in linea con quelli dello studio FIRE-3, con RR (ORR 57.8% vs 53.5%) e PFS (PFS mediana 10.9 vs 10.1 mesi; HR=0.87; 95% CI 0.65-1.17; P=0.353) simili nei due bracci di trattamento e una maggior OS (OS mediana 34.2 vs 24.3 mesi; HR=0.62; 95% CI 0.44-0.89; P=0.009) nei pazienti trattati con panitumumab. Considerando il sottogruppo di pazienti *RAS* wt (wt esoni 2, 3 e 4 di *KRAS* e *NRAS*), aumentano le differenze in termini di OS (OS mediana 41.3 vs 28.9 mesi; HR=0.63; 95% CI 0.39-1.02; P=0.058) nei due bracci e allo stesso tempo se ne evidenziano anche per quanto riguarda la PFS (HR=0.65; 95% CI 0.44-0.96; P=0.029). Il profilo di tossicità appare diverso, con maggiori eventi cutanei e ipomagnesemia nel braccio trattato con panitumumab e maggior frequenza dell'ipertensione in quello trattato con bevacizumab. In termini di risposte obiettive le due terapie continuano ad apparire simili, mentre dei 154 pazienti valutabili, la DoR è stata maggiore nel braccio FOLFOX più panitumumab.³¹⁸

Un'altra analisi retrospettiva ha confrontato il ruolo di panitumumab in associazione a FOLFOX (FOLFOX4) randomizzando 639 pazienti a ricevere terapia con FOLFOX associato a bevacizumab o da solo. Tra i 512 pazienti wt per l'esone 2 di *KRAS* la PFS è apparsa maggiore nel braccio con panitumumab (10.1 vs 7.9 mesi; HR=0.72; 95% CI 0.58-0.90;

P=0.004), così come l'OS (26.0 vs 20.2 mesi; HR=0.78; 95% CI 0.62-0.99; P=0.04). Tra questi pazienti, 108 (17%) avevano altre mutazioni a carico di *RAS*, associate ad inferiori PFS e OS nel braccio contenente panitumumab, analogamente a coloro che avevano mutazione dell'esone 2. Mutazioni di *BRAF* sono state identificate come fattori prognostici negativi.³¹⁹

Un altro studio americano (CALGB/SWOG 80405)³²⁰ ha cercato di chiarire quale sia il miglior biologico nei pazienti senza mutazioni di *RAS*. Sono stati randomizzati 1137 pazienti con mCRC *KRAS* wt per l'esone 2 a ricevere bevacizumab o cetuximab, più una doppietta di chemioterapici contenente 5-FU (70% FOLFOX e 30% FOLFIRI). L'OS era l'endpoint primario dello studio, che non è stato raggiunto (29.0 vs 29.9 mesi nel braccio con bevacizumab e con cetuximab, rispettivamente; HR=0.93, 95% CI 0.78-1.09; p=0.34) e non sono state rilevate differenze significative neanche in termini di PFS (PFS mediana: 10.8 vs 10.4 mesi nei due gruppi; HR=1.04; 95% CI 0.91-1.17; p=0.55). Estendendo l'analisi molecolare in questi pazienti (possibile solo per il 58.9% di essi), tra i 526 pazienti *RAS* wt non sono state osservate differenze in termini di OS (HR=0.9; 95% CI 0.7-1.1; p=0.40) e di PFS (HR=1.1; 95% CI 0.9-1.3; p=0.31), ma coloro che avevano ricevuto cetuximab dimostravano una maggiore tasso di risposte rispetto agli altri (68.6% vs 53.8%; p<0.01).³²¹ Tuttavia solo un sottogruppo dei pazienti *RAS* wt randomizzati era effettivamente valutabile per questo parametro.

In sintesi, gli studi comparativi di MoAbs anti-VEGF rispetto agli anti-EGFR sono stati negativi nei loro endpoint primari e non hanno fornito conclusioni definitive circa quale sia il "miglior biologico" da combinare ad una doppietta di chemioterapici in prima linea nei pazienti con mCRC *RAS* wt. La scelta tra queste due classi di farmaci nei pazienti in cui sono assenti le mutazioni di *RAS* dovrebbe, quindi, esser basata principalmente su considerazioni cliniche come il profilo di tossicità e la necessità di raggiungere una risposta il prima e più profondamente possibile.

Indipendentemente dallo stato mutazionale, anche se doppiette più un biologico sono ampiamente usate come opzioni di prima linea, alcune questioni sono ancora aperte riguardo al loro uso ottimale. In particolare, la durata del trattamento è ancora oggetto di discussione.³²²⁻³²⁵

Tra gli studi in corso sull'associazione tra doppietta di chemioterapici e anti-EGFR ricordiamo VALENTINO³²⁶, ERMES³²⁷ e PANAMA³²⁸.

I dati relativi alla combinazione di monoterapia con anti-EGFR non sono molto robusti. Oggi sono disponibili solo i risultati di uno studio di fase II³²⁹ che valuta l'efficacia di cetuximab più capecitabina in 66 pazienti, con 70 o più anni, non selezionati dal punto di vista molecolare. I risultati di outcome sono comunque incoraggianti con una RR del 31.8%, una PFS e un'OS mediane di 7.1 e 16.1 mesi, rispettivamente. Su 29 pazienti *KRAS* wild-type l'RR è stata del 48.3% e PFS e OS mediane di 8.4 e 18.8 mesi. Questa combinazione meriterebbe un'ulteriore valutazione in studi di fase III.

La combinazione di FOLFOXIRI con gli anti-EGFR è stata valutata in alcuni studi di fase II. Diversamente dalla sua associazione con bevacizumab, l'aggiunta degli anti-EGFR ha dimostrato determinare un incremento delle tossicità del trattamento, che ha portato all'adozione di schedule modificate di FOLFOXIRI. Allo stesso tempo, però, l'utilizzo di cetuximab e panitumumab può permettere il raggiungimento di importanti risultati in termini di attività e di tasso di resezioni secondarie. L'attività promettente di questa associazione è stata osservata inizialmente in popolazioni non selezionate dal punto di vista molecolare negli studi POCHER³³⁰, ERBIRINOX³³¹ e COFI³³² (RR: 79%, 81% and 75%, rispettivamente) e, successivamente, confermata in pazienti wild-type per esone 2 di *KRAS*, come nello studio di fase II di Saridaki e colleghi³³³ (RR: 70%).

Importanti risultati a riguardo sono stati ottenuti anche dallo studio di fase II TRIP³³⁴, utilizzando il panitumumab in una popolazione altamente selezionata dal punto di vista molecolare (RR: 89%).

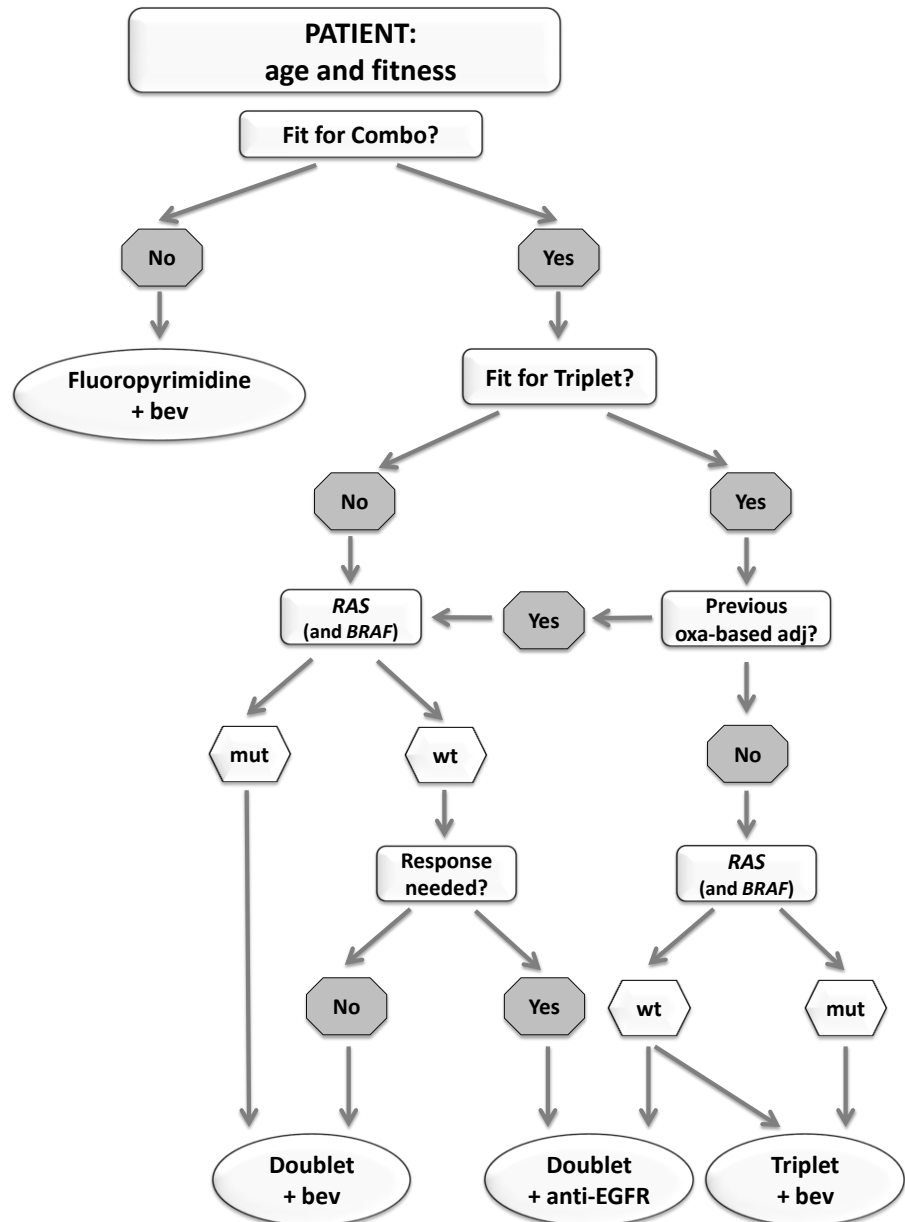
La combinazione di FOLFOXIRI e MoAbs anti-EGFR è oggi un'opzione di trattamento interessante, ma in assenza di dati di fase III non è raccomandata nella pratica clinica. Diversi ulteriori studi clinici stanno attualmente indagando combinazioni di tre farmaci citotossici con un anti-EGFR oltre ad approfondire la questione del loro utilizzo nella terapia di mantenimento: il MACBETH³³⁵⁻³³⁶, di seguito presentato, e il VOLFI³³⁷.

2.2.2.3 Trattamento di prima linea: un algoritmo terapeutico

Come emerso nei paragrafi precedenti, la scelta della terapia da somministrare in prima linea nei pazienti con mCRC appare molto complessa dato il panorama sempre più ampio di farmaci a disposizione e, allo stesso tempo, di fondamentale importanza. Un approccio intensivo, qualora perseguibile in accordo con le caratteristiche cliniche del paziente, permette di ritardare la progressione tumorale, di controllare i sintomi della malattia e in alcuni casi di raggiungere addirittura una completa guarigione, opportunamente integrato con interventi locoregionali. Solo dopo una prima linea efficace i pazienti potranno beneficiare di ulteriori trattamenti sia farmacologici che locoregionali (radioterapia o chirurgia).

Anche se, attualmente, lo standard terapeutico maggiormente riconosciuto e utilizzato è rappresentato da una doppietta di citotossici (FOLFOX o FOLFIRI), associata ad un farmaco biologico, recentemente i risultati del sopracitato studio TRIBE hanno reso disponibile una nuova opzione terapeutica più aggressiva, riservata a pazienti selezionati per età <70 anni e PS <2 o tra 70 e 75 anni e PS=0, non precedentemente trattati con terapia adiuvante a base di oxaliplatino. Nei pazienti *unfit* per trattamenti di combinazione è possibile optare per la monochemioterapia con fluoropirimidine in associazione, quando possibile, al bevacizumab.

Di seguito è riportato un algoritmo²⁷⁴ che riassume le possibili strategie terapeutiche da impiegare in prima linea di trattamento:



L'algoritmo proposto suggerisce, prima di tutto, di selezionare i pazienti idonei, dal punto di vista clinico, alla terapia di combinazione. Gli *unfit* riceveranno monochemioterapia ed eventualmente bevacizumab, i *fit* verranno ulteriormente valutati. Essi potranno ricevere la tripletta e bevacizumab se idonei per età, PS e mancata precedente terapia

adiuvante con oxaliplatino. In caso di scelta di una doppietta, il farmaco biologico da combinare sarà necessariamente il bevacizumab se presenti mutazioni a carico di *RAS*, mentre, nei pazienti wt, verrà scelto il cetuximab o il bevacizumab essenzialmente in base alla necessità di una risposta rapida, dato che l'anti-EGFR è stato associato a precoce e maggior Early Tumor Shrinkage (ETS) e Deepness of Response (DoR).

Capitolo 3. FOLFOXIRI più cetuximab nel trattamento di prima linea di pazienti affetti da carcinoma coloretale metastatico *RAS* e *BRAF* wild-type: risultati dello studio di fase II randomizzato MACBETH.

3.1 Background e razionale

Le terapie a bersaglio molecolare affiancano ormai da alcuni anni i farmaci citotossici nel trattamento del tumore del colon-retto metastatico. Come già emerso nel precedente capitolo, le due classi maggiormente attive in questo setting e, quindi, maggiormente utilizzate nella pratica clinica, sono le molecole anti-angiogeniche, in particolar modo il bevacizumab, e gli anticorpi monoclonali anti-EGFR, come cetuximab e panitumumab.

L'efficacia e il tollerabile profilo di sicurezza del bevacizumab sono stati ampiamente dimostrati in associazione a tutte le possibili combinazioni di chemioterapia di diversa intensità (dalla monoterapia alla tripletta), così come nella terapia di mantenimento^{198,200,243,263,294-310}.

La classe dei MoAbs anti-EGFR è stata introdotta più recentemente, investigata inizialmente in linee successive alla prima e successivamente in quest'ultima. Come discusso nel capitolo precedente, possono essere somministrati soltanto in pazienti *RAS* wt e, anche i pazienti *BRAF* mutati vengono spesso esclusi dal ricevere questa classe di farmaci per il minimo beneficio che ne possono derivare.^{163-170,191-197} L'aggiunta degli anticorpi anti-EGFR, inoltre, si associa ad un incremento di alcune tossicità chemio-correlate, diversamente da bevacizumab.

I pazienti *RAS* mutati hanno, quindi, un solo farmaco a bersaglio molecolare come opzione di prima linea, l'anti-angiogenico bevacizumab, mentre la scelta tra questo e gli anti-EGFR in pazienti *RAS* wild-type è attualmente basata soprattutto su considerazioni cliniche come il profilo di tossicità e la necessità di raggiungere una risposta il prima e il più profondamente possibile. Studi di confronto tra questi due trattamenti in pazienti non mutati non hanno, infatti, raggiunto i loro obiettivi primari di OS e PFS, ma hanno dimostrato una maggior attività degli anti-EGFR su parametri radiologici quali il tasso di risposta, la DoR e l'ETS.³¹⁴⁻³¹⁹

I dati disponibili riguardano, in particolar modo, la loro associazione con doppiette di chemioterapici (FOLFIRI e FOLFOX). L'aggiunta di cetuximab a 5-fluorouracile e leucovorin più irinotecan o oxaliplatino, come terapia di prima linea nel mCRC, ha dimostrato, infatti, di ridurre il rischio di progressione della malattia e di aumentare le possibilità di risposta in pazienti *KRAS* wild-type, vantaggi ulteriormente amplificati quando la selezione molecolare estesa identifica i pazienti *RAS* wild-type.

Un'ampia metanalisi¹⁶⁸ condotta sulla base di dieci studi controllati e randomizzati (RCTs) comprendenti migliaia di pazienti con CRC in fase avanzata, ha confermato il vantaggio dato dall'aggiunta di un farmaco biologico anti-EGFR alla chemioterapia standard nei pazienti *KRAS* wt, nelle prime tre linee di trattamento. La sua somministrazione si associava, infatti, a maggiori PFS, OS e Best Overall Response così da giustificare fortemente l'utilizzo nella pratica clinica.

Più di recente alcune piccole esperienze di fase II hanno valutato l'attività e la fattibilità di regimi modificati di FOLFOXIRI in associazione a cetuximab o panitumumab, in prima linea del trattamento di pazienti con mCRC. Risultati interessanti soprattutto in termini di risposte obiettive si sono osservati inizialmente in popolazioni non selezionate dal punto di vista molecolare negli studi POCHER³³⁰, ERBIRINOX³³¹ e COFI³³² (RR: 79%, 81% and 75%, rispettivamente) e, successivamente, confermati in pazienti wild-type per l'esone 2 di *KRAS*³³³.

Garufi et al.³³⁰ hanno pubblicato sulla rivista British Journal of Cancer i risultati definitivi dello studio di fase II POCHER, che ha valutato in prima linea la combinazione di cetuximab e irinotecan, oxaliplatino, fluorouracile e leucovorin, cronomodulati (chrono-IFLO) in 43 pazienti con metastasi epatiche da tumore del colon-retto non resecabili, allo scopo di osservare un elevato tasso di resecabilità secondaria, endpoint primario dello studio. Alla valutazione macroscopica 26 pazienti (60%) hanno ricevuto una resezione completa dopo una mediana di 6 cicli (3-15), mentre una risposta parziale si è rilevata in 34 pazienti (79%). L'OS

mediana era di 37 mesi (95% CI; 21-53 mesi), la sopravvivenza a 2 anni del 68% nell'intera popolazione esaminata, dell'80.6% nei pazienti resecati e 47.1% nei non-resecati ($p=0.01$), mentre la PFS mediana era di 13 mesi. La tossicità più importante e limitante si è rivelata essere la diarrea di grado 3-4, verificatasi nel 93% e nel 36% dei pazienti, rispettivamente prima e dopo la riduzione della dose.

Un altro studio di fase II (ERBIRINOX)³³¹ ha testato una combinazione di cetuximab e FOLFIRINOX (LOHP 85 mg/sqm d1, CPT-11 180 mg/sqm d1, LV 200 mg/sqm d1, 5-FU 400 mg/sqm in bolo seguito da 2400 mg/sqm in 46 ore di infusione, d1, ogni 2 settimane) nella prima linea di trattamento in 42 pazienti con mCRC non resecabile. Cinque pazienti (11.9%) hanno mostrato una risposta completa (RC), con una durata media di 23.1 mesi (95% CI, 10.8-39.7 mesi), e il tasso di risposte obiettive era dell'80.9% (95% CI; 65.9%-91.4%). Gli eventi avversi di grado 3-4 più frequenti sono stati la diarrea (52%), la neutropenia (38%) e l'astenia (32%).

Anche lo studio COFI³³² di Folprecht et al. valutava la combinazione di cetuximab e FOLFOXIRI, attraverso una somministrazione con dose-escalation, confermando un tasso complessivo di risposte del 75% (95%; CI 51-91%). La PFS mediana era, inoltre, di 16 mesi (95% CI; 12.6-19.4) e l'OS mediana di 33 mesi (95%CI; 26.2-39.8). Lo stesso gruppo sta eseguendo lo studio CELIM2³³⁸, randomizzando i pazienti *RAS* wild-type a cetuximab più FOLFOXIRI o FOLFIRI, mentre quelli *RAS* mutati ricevono bevacizumab più FOLFOXIRI o FOLFIRI. Lo scopo primario è quello di valutare l'efficacia dei regimi utilizzati in termini di RR (Response Rate) in pazienti con metastasi epatiche da CRC non resecabili.

Lo studio di fase II³³³ messo a punto da Saridaki e colleghi ha valutato gli effetti della terapia con FOLFOXIRI più cetuximab in 30 pazienti *KRAS* wt (esone 2) riportando una RR e un tasso di resezioni radicali del 70% e del 37%, rispettivamente.

Come già riportato nel precedente capitolo, importanti risultati sull'attività di questo tipo di associazione sono stati ottenuti anche dallo studio di

fase II TRIP³³³, testando la combinazione di FOLFOXIRI e panitumumab in una popolazione, altamente selezionata dal punto di vista molecolare, di 37 pazienti con mCRC non resecabile *KRAS/BRAF/NRAS/HRAS* wild-type. Trentatré pazienti hanno raggiunto una risposta obiettiva (RR: 89%) e 13 (35%) una resezione radicale secondaria delle metastasi. In seguito all'osservazione di tossicità gastrointestinali gravi in due dei primi tre pazienti arruolati per lo studio, la dose di 5-FU è stata ridotta. Successivamente a questo accorgimento gli eventi di grado 3 e 4 più comuni sono stati la neutropenia (48%), la diarrea (35%), l'astenia (27%), la stomatite (14%) e il rash cutaneo (14%). La combinazione di panitumumab e FOLFOXIRI è attualmente indagata anche nello studio VOLFI³³⁷ (FOLFOXIRI più panitumumab versus FOLFOXIRI).

Nella ricerca del mantenimento ottimale la strategia può essere basata sul concetto di intermittenza, coinvolgendo per intero il regime terapeutico prestabilito e alternandolo a pause, oppure sull'intensità di trattamento, utilizzando la terapia up-front depotenziata o farmaci diversi.³³⁹

Prima dell'introduzione nella pratica clinica delle target therapies, infatti, vari studi randomizzati di fase III (OPTIMOX1³²², OPTIMOX2³²³, COIN³¹² e GISCAD³²⁴) hanno dimostrato che intervalli "chemotherapy-free" e "chemotherapy-light" alternati a periodi "chemioterapia-full" sono opzioni di possibile utilizzo.

Studi più recenti, invece, hanno valutato il ruolo della terapia di mantenimento con regimi meno intensivi in pazienti che avevano ottenuto una stabilizzazione della malattia o una risposta alla terapia di induzione.

Queste strategie hanno lo scopo di consolidare il risultato ottenuto, ridurre la tossicità associata alla terapia continua e migliorare la qualità della vita del paziente, pur non determinando una compromissione in termini di sopravvivenza.

Sono stati valutati a questo scopo farmaci anti-angiogenici come il bevacizumab e gli inibitori di EGFR, da soli o in associazione ad una fluoropirimidina.

Il bevacizumab è risultato essere una strategia di mantenimento promettente, dal momento che ciò impedirebbe il rebound pro-angiogenico, che si è documentato avvenire a livello tumorale, in seguito alla sospensione del farmaco.³⁴⁰ Allo stesso modo, una rapida progressione della malattia è stata dimostrata in pazienti con tumore renale trattato con altri farmaci anti-angiogenici (pazopanib o sunitinib), durante interruzioni del trattamento.³⁴¹ Anche se non è del tutto chiaro il meccanismo alla base di questa evidenza, sembra essere coinvolto il VEGF prodotto dallo stroma dell'ospite³⁴², tale che l'esposizione prolungata a farmaci anti-angiogenici possa bloccare la produzione paracrina di fattori pro-angiogenici e, in ultima analisi, controllare la crescita tumorale.³⁴³

Recentemente, gli studi randomizzati nord europei CAIRO3 e AIO KRK 0207 hanno stabilito lo standard per la terapia di mantenimento con bevacizumab.³⁴⁴⁻³⁴⁵ CAIRO3³⁴⁴ è stato progettato per studiare l'efficacia del trattamento di mantenimento con capecitabina metronomica e bevacizumab. I pazienti con CRC avanzato non operabile, che avevano ottenuto una risposta o una stabilizzazione di malattia dopo 6 cicli di oxaliplatino, capecitabina e bevacizumab, sono stati assegnati in modo casuale a capecitabina (625 mg/m² due volte al giorno in continuo) più bevacizumab (5,5 mg/kg ogni tre settimane) o la sola osservazione. Sia la PFS2, end-point primario dello studio, definita come il tempo dalla randomizzazione alla progressione in seguito alla reintroduzione del trattamento iniziale, sia la PFS1, erano maggiori nel braccio di mantenimento (PFS2: 11.7 vs 8.5 mesi; HR= 0.67; 95% CI 0.56-0.81; P <0.0001; PFS1: 8.5 vs 4.1 mesi; HR=0.43; 95% CI 0.36-0.52; P<0.0001). Nonostante il vantaggio in PFS1 e PFS2, la differenza in OS non ha raggiunto la significatività statistica (21.6 mesi nel braccio del mantenimento vs 18.1 mesi nel braccio di osservazione; HR=0.89; 95% CI, 0.73-1.07; P=0.22). Una maggiore incidenza di neurotossicità grave (10% vs 5%) e hand-foot syndrome (22% vs 0%) è stata osservata nei

pazienti che hanno ricevuto la terapia di mantenimento, tuttavia, nessuna differenza i termini di qualità di vita è stata segnalata tra i bracci di trattamento.

Nello studio AIO KRK 0207³⁴⁵, un totale di 476 pazienti con mCRC non resecabile che avevano raggiunto almeno la stabilità di malattia in seguito a 6 mesi di terapia con bevacizumab in associazione ad una chemioterapia contenente oxaliplatino, sono stati assegnati in modo casuale a bevacizumab e fluoropirimidina (braccio A, considerato standard), bevacizumab da solo (braccio B) o osservazione (braccio C). Lo scopo dello studio era di valutare la non inferiorità del solo bevacizumab e dell'osservazione nei confronti della terapia di combinazione, con HR fissato ad 1.43 per la non-inferiorità. Il trattamento di mantenimento è stato continuato fino alla progressione, tossicità inaccettabile, rifiuto del paziente o fino a quando non è stato più considerato utile nella cura del paziente. La non-inferiorità nei confronti del braccio standard è stata dimostrata solo per il bevacizumab da solo (sopravvivenza mediana libera da tumore: 6.5 vs 6.8 mesi; HR=0.98; 95% CI, 0.76-1.26; P = 0.85). Tuttavia, l'OS era simile tra i bracci di trattamento (23.8 vs 26.2 vs 23.1 mesi, rispettivamente nei bracci A, B e C). In modo coerente con i risultati dello studio CAIRO3, il trattamento di mantenimento è stato ben tollerato e non ha causato eccessive tossicità. A questi si aggiungono anche i risultati del piccolo studio europeo di fase III SWS-SAKK-41/06³⁴⁶, che ha confrontato il mantenimento con bevacizumab (7,5 mg/kg ogni tre settimane) rispetto ad osservazione, in 262 pazienti con CRC dopo 4-6 mesi di chemioterapia standard di prima linea più bevacizumab, confermando il beneficio del farmaco anti-angiogenico.

Complessivamente, l'analisi combinata dei tre trials³⁴⁷ riporta un vantaggio, a favore della terapia di mantenimento rispetto alla sola osservazione, maggiore in termini di PFS (HR=0.56) che di OS (HR=0.89).

Per quanto riguarda gli anti-EGFR, sono attualmente disponibili solo dati di studi di fase II randomizzati, in pazienti *KRAS* wild-type. Lo studio di

fase II COIN-B³¹³ ha indagato due strategie di chemioterapia intermittente con FOLFOX più cetuximab, randomizzando i 226 pazienti a continuare o meno il cetuximab negli intervalli liberi da chemioterapia. Anche se non comparativo, lo studio ha riportato PFS, OS e intervalli "chemotherapy-free" più lunghi nel caso della somministrazione continua di cetuximab (OS mediana 22.2 vs 16.8 mesi; PFS mediana 5.8 vs 3.1 mesi; intervallo mediano "chemotherapy-free" 5.5 vs 3.7 mesi). Gli eventi avversi di tipo 3-4 più frequenti sono stati reazioni cutanee (27% nel braccio con terapia intermittente vs 22% nel braccio con terapia continua), neutropenia (29% vs 33%), diarrea (18% vs 25%) e letargia (26% vs 21%).

Lo studio di fase II MACRO-2³²⁵ ha, inoltre, dimostrato, randomizzando 193 pazienti, che l'interruzione di FOLFOX più cetuximab dopo 8 cicli, continuando poi solo con cetuximab fino alla progressione di malattia, non era inferiore in termini di PFS alla somministrazione di FOLFOX più cetuximab fino alla progressione. Non c'erano differenze statisticamente significative neanche in termini di ORR e OS tra i due bracci dello studio. La tollerabilità è risultata essere accettabile in entrambi i gruppi di pazienti.

Infine, anche P. Pfeiffer et al. hanno valutato, nello studio NORDIC-7.5³⁴⁸, efficacia e sicurezza del mantenimento con cetuximab bisettimanale fino a progressione, in 152 pazienti con mCRC non resecabile *KRAS* wild-type, dopo 4 mesi di terapia di induzione con la combinazione di cetuximab e il regime in bolo FLOX (5-FU, LV, oxaliplatino). La somministrazione di cetuximab ogni due settimane sembra integrarsi in modo ben tollerato e sicuro all'interno di una strategia di chemioterapia intermittente, garantendo periodi liberi da chemioterapia più lunghi.

I pazienti con mCRC *KRAS* wild type sono, quindi, di solito sensibili all'inibizione di EGFR tramite anticorpi monoclonali specifici, ma, frequentemente, entro alcuni mesi dall'introduzione di questi farmaci, sviluppano una resistenza che li rende inefficaci

Nel tentativo di spiegare i meccanismi alla base dello sviluppo di resistenza ai farmaci anti-EGFR, secondariamente alla loro somministrazione in pazienti inizialmente sensibili, si è sviluppata un'ipotesi, che costituisce il razionale biologico dell'esposizione sequenziale del paziente ad anticorpi anti-EGFR e anti-VEGF.

Un grande interesse hanno suscitato, infatti, vie di trasduzione del segnale alternative a quella mediata da EGFR, che possono supportare la crescita cellulare nel momento in cui questa risulti bloccata: una tra tutte è quella che coinvolge VEGF. Nelle linee cellulari di tumori umani a carico del distretto testa-collo (A431)³⁴⁹ e del colon-retto (GEO)³⁵⁰, divenute resistenti al cetuximab, si è rilevato un significativo aumento delle proteine VEGF e del corrispondente mRNA.

Nel primo caso, Vioria-Petit et al.³⁴⁹ hanno esaminato sei linee cellulari resistenti agli anti-EGFR in vitro, riscontrando alterati livelli di VEGF in cinque di esse. Benché il motivo di ciò non sia del tutto chiaro, appare fondamentale il ruolo sia di oncogeni, sia di geni oncosoppressori. I primi, infatti, come Ras, src e erbB2/neu, quando attivati, sono in grado di up-regolare l'espressione di VEGF, stesso effetto che può essere determinato dalla mutazione o inattivazione di geni oncosoppressori quali p53, VHL o PTEN. Cellule caratterizzate da alterazioni geniche dell'uno o dell'altro tipo verrebbero, quindi, selezionate dalla pressione farmacologica degli anti-EGFR. In alternativa, possono essere coinvolte e alterate altre vie di trasduzione del segnale localizzate a valle dell'EGFR, come quelle a carico di PI3 kinase (phosphatidylinositol 3'-kinase) e/o src kinase. Indipendentemente dal meccanismo, l'entità dell'aumento del VEGF rilevato è in grado di aumentare significativamente l'angiogenesi tumorale. L'elevato potere angiogenico delle cellule neoplastiche che divengono resistenti agli anticorpi monoclonali anti-EGFR gioca un ruolo estremamente rilevante, come dimostrato dall'intensa vascolarizzazione e dalla crescita aberrante dei vasi sanguigni rilevata.³⁵¹

Ciardiello et al.³⁵⁰ hanno, invece, studiato lo sviluppo di resistenza a farmaci anti-EGFR in cellule, inizialmente sensibili, in corso di trattamento a lungo termine con cetuximab (C225), gefitinib (ZD1839;

inibitore selettivo tirosin-chinasico di EGFR) e vandetanib (ZD6474). Quest'ultima molecola agisce, come inibitore selettivo tirosin-chinasico, non solo su VEGFR-2, come inizialmente si pensava, ma anche su VEGFR-1, RET e EGFR. Il vandetanib, diversamente dagli altri due farmaci, grazie all'azione aggiuntiva su VEGF e sulla corrispondente via di trasduzione del segnale a livello delle cellule endoteliali, potrebbe essere in grado di bloccare la crescita tumorale in vivo anche una volta sviluppatasi la resistenza agli altri anti-EGFR. Nelle cellule resistenti si è rilevata anche un'overespressione di VEGFR-1, un netto aumento della secrezione di VEGF e PlGF (Placental Growth Factor) e un'incrementata capacità di migrazione, rispetto alle linee parentali.³⁵² Il contributo di VEGFR-1 al fenotipo resistente è stato ulteriormente confermato dalla dimostrazione che il suo silenziamento in queste cellule possa parzialmente ripristinare la sensibilità ai farmaci anti-EGFR e, conseguentemente, ridurre il loro aumentato potere metastatico. Allo stesso tempo, la sovraespressione di VEGFR-1 in cellule wild-type conferisce resistenza a queste molecole.

Pur essendo attualmente disponibili solo evidenze precliniche, questi dati rappresentano un'ipotesi interessante sulla potenziale efficacia della somministrazione sequenziale di un anti-EGFR e un anti-VEGF, da indagare ulteriormente mediante studi clinici. Tutte le prove sopra-riportate suggeriscono, infatti, che una strategia innovativa e promettente nel trattamento di pazienti affetti da mCRC molecolarmente selezionati potrebbe essere l'esporre subito agli agenti più attivi (cioè la combinazione tripletta di FOLFOXIRI più cetuximab), con lo scopo di ottenere un rapido controllo della malattia e la massima riduzione volumetrica tumorale e, successivamente, utilizzare una terapia di mantenimento meno aggressiva per inibire la ricrescita tumorale.

Lo studio di fase II MACBETH³³⁵⁻³³⁶ è stato disegnato, quindi, sulla base di tutte le evidenze e le considerazioni sopra-riportate. Esso ha valutato l'efficacia di un trattamento di induzione di 4 mesi con cetuximab, in combinazione con un regime modificato della tripletta FOLFOXIRI

(mFOLFOXIRI), nella prima linea di pazienti *RAS* e *BRAF* wild-type. I pazienti sono stati randomizzati nel successivo mantenimento a cetuximab o bevacizumab.

In conclusione, i punti cardine del razionale dello studio sono:

1) Studiare e approfondire efficacia e sicurezza del regime di combinazione di chemioterapia intensiva e cetuximab, sulla base della già dimostrata attività sia della tripletta FOLFOXIRI che dei farmaci anti-EGFR, ma essendo ancora pochi e precoci i dati che ne possano giustificare un utilizzo di associazione della pratica clinica.

2) Valutare la possibile riduzione della durata dell'induzione ad un periodo breve (4 mesi) per poter successivamente consolidare, tramite la terapia di mantenimento, i risultati ottenuti, diminuendo allo stesso tempo le tossicità chemo-correlate e migliorando la qualità di vita del paziente, senza comprometterne la sopravvivenza globale.

3) Esplorare quale sia il miglior farmaco biologico da somministrare durante il mantenimento dopo la terapia di induzione contenente cetuximab, proseguendo l'anti-EGFR o eseguendo uno switch a bevacizumab. La somministrazione dell'anti-angiogenico potrebbe, infatti, sfruttare l'eventuale potenziato potere angiogenico delle cellule neoplastiche in seguito ad acquisizione di resistenza agli anticorpi monoclonali anti-EGFR, che rende quest'ultimi scelte non ottimali per la terapia di mantenimento.

3.2 Materiali e metodi

3.2.1 Selezione dei pazienti

I principali criteri di inclusione erano i seguenti:

- diagnosi di adenocarcinoma colorettales confermata istologicamente;
- disponibilità di materiale fissato in formalina e incluso in paraffina del tumore primitivo e/o delle metastasi;
- stato *RAS* e *BRAF* wild-type del tumore primitivo o delle relative metastasi;
- metastasi misurabili secondo i criteri RECIST 1.1 e non resecabili, in paziente non precedentemente trattato;
- età compresa tra 18 e 75 anni con PS <2 (se 71-75 anni necessario PS=0), qualsiasi sesso;
- aspettativa di vita maggiore di 3 mesi;
- adeguata funzionalità emopoietica, renale ed epatica;
- mancata precedente terapia adiuvante contenente oxaliplatino, se terminata entro un anno dalla recidiva, o fluoropirimidine, se terminata entro sei mesi dalla recidiva;
- mancata radioterapia nelle ultime sei settimane o chirurgia nelle ultime quattro settimane;
- consenso informato scritto alle analisi mutazionali e al trattamento.

3.2.2 Valutazione dello stato mutazionale di *RAS* e *BRAF*

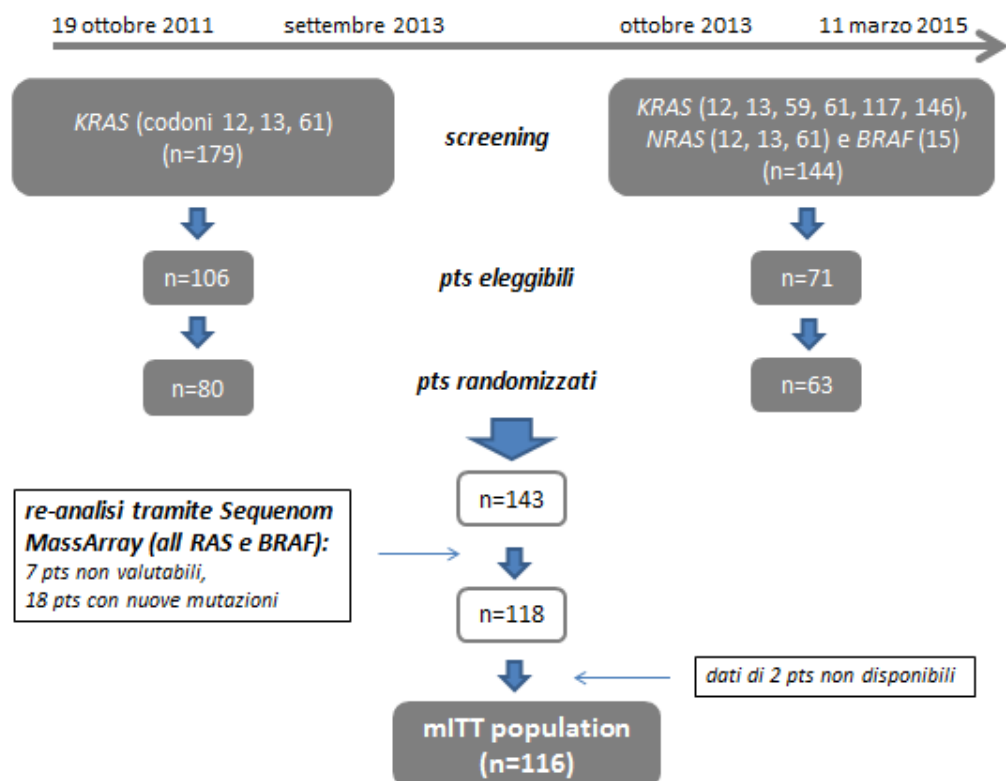
Le analisi mutazionali di *RAS* e *BRAF* sono state eseguite in modo centralizzato nell'unità di Anatomia Patologica diretta dalla Professoressa G. Fontanini, del Dipartimento di Chirurgia dell'Università di Pisa, su campioni tumorali fissati in formalina e inclusi in paraffina provenienti dalle lesioni neoplastiche primitive e/o secondarie.

Tra l'ottobre 2011 e il settembre 2013 sono stati analizzati, tramite PCR, 179 pazienti ricercando mutazioni a carico di *KRAS* nei codoni 12, 13 e 61, di cui 106 sono risultati eleggibili e 80 sono stati randomizzati.

Successivamente, dall'ottobre 2013 al marzo 2015, altri 144 pazienti sono stati valutati, ricercando mutazioni per *KRAS* nei codoni 12, 13, 59, 61, 117 e 146 e per *NRAS* nei codoni 12, 13 e 61, tramite pirosequenziamento, oltre che per *BRAF* (mutazione V600E). In seguito a queste più recenti analisi, 71 pazienti sono risultati eleggibili e 63 sono stati randomizzati.

Dei 143 pazienti randomizzati complessivamente ne sono stati esclusi 27, di cui 18 in seguito ad una re-analisi (*all RAS e BRAF*) tramite Sequenom MassArray, con cui sono state individuate ulteriori mutazioni a carico di questi geni, altri 7 a causa dell'impossibile valutazione e 2 per mancanza di dati clinici.

Pertanto, si è ottenuta una *intention-to-treat* population modificata (mITT) di 116 pazienti, di cui saranno presentati i risultati.



3.3 Endpoint dello studio

L'obiettivo primario dello studio è, quindi, la valutazione dell'efficacia di una terapia di induzione con mFOLFOXIRI e cetuximab, seguita dal mantenimento con cetuximab o bevacizumab, nella prima linea di trattamento di pazienti *RAS* e *BRAF* wild-type con mCRC. Lo studio in oggetto è un trial di fase II randomizzato non comparativo, con endpoint primario la percentuale di pazienti liberi da progressione della malattia a 10 mesi dalla randomizzazione, rispetto al totale dei pazienti arruolati, definita come 10months-Progression Free Rate (10 months-PFR).

Ipotizzando in base ai dati della letteratura un PFR a 10 mesi dalla randomizzazione del 50% in pazienti *RAS* e *BRAF* wt trattati con FOLFIRI e cetuximab (studio CRYSTAL), si è considerato di poter incrementare in ciascuno dei bracci sperimentali il tasso di pazienti liberi da progressione al 70%. Con errori alfa e beta del 5 e 10% rispettivamente, secondo il disegno a singolo stadio di Fleming 53 pazienti per braccio erano necessari. Ciascuno dei due bracci sarebbe stato considerato promettente se almeno 33 pazienti di ogni braccio fossero stati vivi e liberi da progressione a 10 mesi.

Tra gli obiettivi secondari abbiamo valutato, in ogni braccio dello studio:

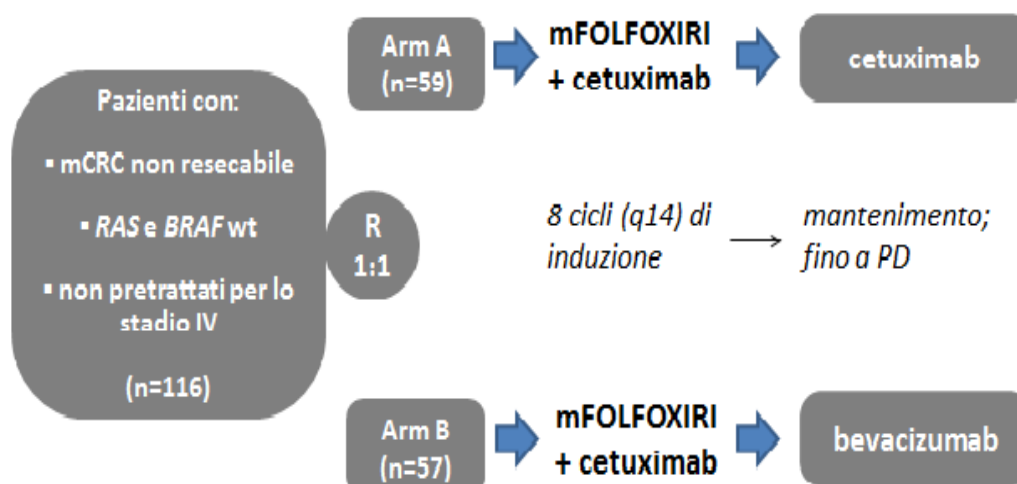
- il tasso di risposta (RR, Response Rate) osservata durante le fasi di induzione e di mantenimento del trattamento, definita come la percentuale di pazienti, rispetto al totale di soggetti arruolati, ad aver ottenuto una risposta completa (CR) o parziale (PR), secondo i criteri RECIST 1.1, durante le fasi di induzione e di mantenimento del trattamento;
- la proporzione di pazienti sottoposti a resezione secondaria di metastasi (Resection Rate) entro 10 mesi dalla randomizzazione, che sia risultata radicale, con margini microscopicamente indenni da malattia (R0);
- il tempo al fallimento della strategia terapeutica, inteso come progressione della malattia durante la terapia di induzione, mancata

sua somministrazione, introduzione di un nuovo farmaco diverso da quelli previsti o morte del paziente;

- il tempo alla seconda progressione di malattia, come intervallo di tempo dalla randomizzazione al riscontro oggettivo di una seconda progressione della malattia o alla morte;
- la sopravvivenza libera da progressione (PFS);
- la durata della sopravvivenza globale (OS);
- il profilo di sicurezza.

3.4 Disegno dello studio e trattamento somministrato

Di seguito il disegno dello studio MACBETH:



La schedula della terapia di induzione con FOLFOXIRI e cetuximab somministrata al giorno 1 e ripetuta ogni 2 settimane per 8 cicli, prevedeva:

- CETUXIMAB 500 mg/sqm e.v. in 60 minuti, seguito da
- IRINOTECAN 130 mg/sqm e.v. in 60 minuti, seguito da
- OXALIPLATINO 85 mg/sqm e.v. in 120 minuti, in concomitanza con
- I-LV 200 mg/sqm e.v. in 120 minuti, seguiti da
- 5-FLUOROURACILE 2400 mg/sqm e.v. in 48 h di infusione continua.

Le dosi di 5-fluorouracile e irinotecan utilizzate sono ridotte rispetto al regime standard con FOLFOXIRI utilizzato dal Gruppo Oncologico Nord-Ovest²³¹, che prevede la somministrazione di 165 mg/sqm di irinotecan e 3200 mg/sqm di 5-FU.

Queste sono state ridotte, in linea con gli altri studi basati sulla stessa combinazione³³⁰⁻³³⁴, a causa dell'aumentata tossicità riportata dall'associazione di farmaci anti-EGFR a doppiette²³³ e triplete^{329,331} chemioterapiche contenenti irinotecan, in termini di diarrea di grado 3-4.

La durata della terapia di induzione (4 mesi) è, inoltre, ridotta rispetto a quella prevista da protocolli di studi quali FOIB¹⁹⁸, TRIBE²⁰⁰ e OPAL³⁰⁶,

che prevedevano 12 cicli bisettimanali e quindi un trattamento complessivo di 6 mesi, ma comune ad altri trials in corso (MOMA³⁰⁹, STEAM³⁵³, TRIBE-2³¹⁰).

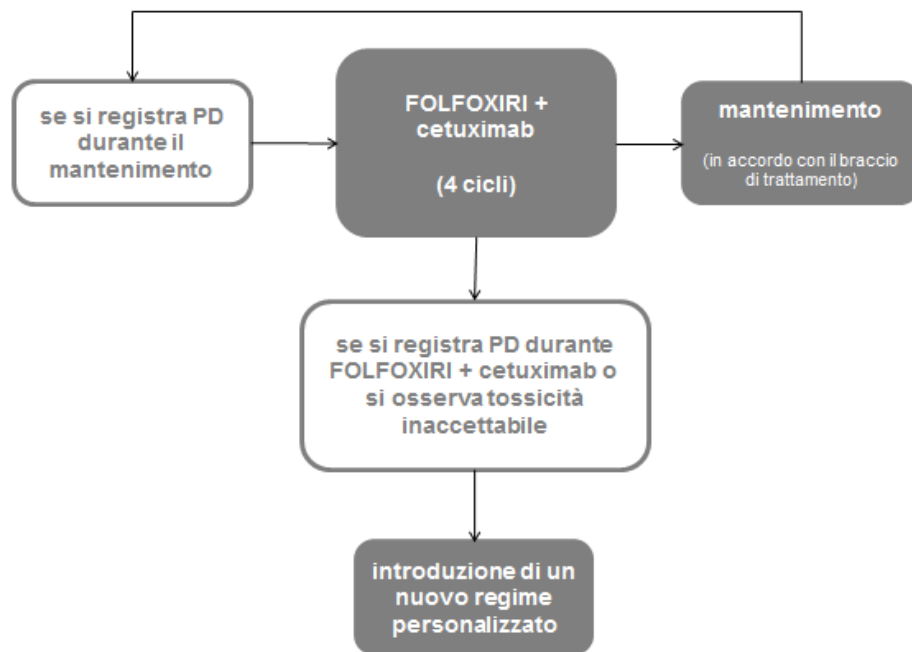
Successivamente a questa fase di induzione è stata effettuata una valutazione chirurgica.

Qualora il paziente non fosse risultato idoneo alla resezione delle metastasi, sarebbe stata proseguita la terapia medica come mantenimento, diversa a seconda del braccio di trattamento, da ripetere ogni 2 settimane fino a progressione di malattia, tossicità inaccettabile, morte, rifiuto o ritiro del consenso da parte del paziente:

- CETUXIMAB 500 mg/sqm e.v. in 60 minuti, giorno 1
- o
- BEVACIZUMAB 5 mg/kg e.v. in 30 minuti, giorno 1

Nel caso in cui il paziente fosse stato ritenuto resecabile prima di aver completato gli 8 cicli di induzione, una volta eseguita la metastasectomia, ad esso, secondo il protocollo, sarebbe stato somministrato un numero di ulteriori cicli di FOLFOXIRI e cetuximab, tale da arrivare a 12 complessivi, e un successivo mantenimento di 6 mesi scelto in base al braccio di randomizzazione.

In caso si fosse riscontrata progressione di malattia in corso di mantenimento, il paziente sarebbe stato nuovamente trattato con 4 cicli di FOLFOXIRI e cetuximab, modificandone se necessario i dosaggi, senza introdurre farmaci diversi da quelli previsti (ad eccezione della sostituzione del 5-FU con capecitabina), e successivo mantenimento con farmaco biologico opportuno. Una PD in corso di terapia di induzione necessitava invece l'introduzione di un nuovo regime personalizzato, di seconda linea.



3.5 Risultati e discussione

3.5.1 Caratteristiche della popolazione

Tra l'ottobre 2011 e il febbraio 2015 sono stati valutati 323 pazienti in 21 centri italiani. In particolare, tra l'ottobre 2011 e il settembre 2013 sono stati randomizzati 80, di 179 pazienti valutati, risultati *KRAS* wild-type all'analisi tramite PCR (codoni 12, 13 e 61) e, successivamente ad un emendamento, tra l'ottobre 2013 e il marzo 2015, sono stati inclusi altri 63, di 144 pazienti valutati, risultati *KRAS* (codoni 12, 13, 59, 61, 117 e 146), *NRAS* (codoni 12, 13 e 61) e *BRAF* wild-type (mutazione V600E) all'analisi tramite pirosequenziamento. In seguito ad un'ulteriore selezione su base molecolare tramite Sequenom MassArray dei 143 pazienti randomizzati, su tutti i geni e i codoni citati, 25 pazienti sono stati esclusi a causa dell'identificazione di altre mutazioni o per la mancata possibilità di eseguire l'analisi molecolare e altri 2 pazienti per la non disponibilità dei dati. Questo processo ha quindi portato all'identificazione di una *intention-to-treat* (ITT) population modificata (mITT) di 116 pazienti, così distribuiti nei due bracci di trattamento: 59 pazienti nel braccio A e 57 pazienti nel braccio B.

Nei paragrafi seguenti, saranno riportati i risultati osservati nella mITT.

Le caratteristiche demografiche e cliniche sono risultate sovrapponibili nei due bracci di trattamento, con una prevalenza netta, nella popolazione totale, del sesso maschile (71% vs 29%) e di pazienti in buone condizioni cliniche, con una minoranza di casi di PS=1 (11%) e nessun caso di PS=2.

La diagnosi di malattia in stadio IV era stata effettuata, nella maggior parte dei casi (84%), in modo sincrono a quella del tumore primitivo. I pazienti con ridotta estensione della malattia metastatica, espressa dalla presenza di una sola lesione secondaria, erano il 53%, mentre quelli con metastasi soltanto epatiche, il 45%.

Lievi differenze si riscontrano nel braccio con cetuximab (braccio A), rispetto al braccio B, in termini di sede del tumore primitivo, essendo maggiore la percentuale di localizzazioni al colon destro (24% vs 12%).

Complessivamente, soltanto il 12% della mITT population aveva ricevuto un trattamento adiuvante in seguito a precedente chirurgia radicale del tumore primitivo. Questo numero di pazienti così limitato è dovuto, in parte, ai criteri di inclusione dello studio, che prevedevano di escludere pazienti a cui era stata somministrata terapia adiuvante contenente oxaliplatino, se terminata entro un anno dalla recidiva, o fluoropirimidine, se terminata entro sei mesi dalla recidiva.

%	Braccio A (n=59)	Braccio B (n=57)	mITT population (n=116)
Sesso (M/F)	68/32	74/26	71/29
Età mediana (range)	61 (33-74)	59 (34-75)	60 (33/75)
ECOG PS (0/1-2)	90/10	88/12	89/11
Metastasi sincrone (Sì / No)	86 / 14	82 / 18	84 / 16
Precedente CT adiuvante (Sì / No)	10 / 90	14 / 86	12 / 88
Sede del tumore primitivo (destra / sinistra / retto)	24 / 51 / 25	12 / 62 / 26	18 / 56 / 26
Numero sedi di metastasi (1 / >1)	56 / 44	51 / 49	53 / 47
Malattia secondaria a sola localizzazione epatica (Sì / No)	47 / 53	42 / 58	45 / 55
Primitivo resecato (Sì / No)	59 / 41	58 / 42	59 / 41

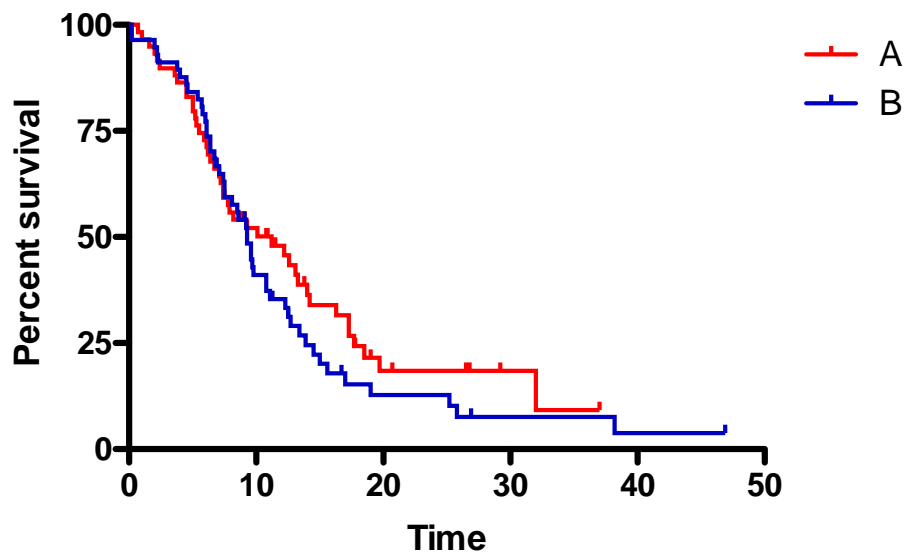
3.5.2 Analisi di sopravvivenza

L'obiettivo primario dello studio non è stato raggiunto in nessuno dei due bracci di trattamento, poiché il tasso di pazienti liberi da progressione a 10 mesi dalla randomizzazione (10 months-PFR) è risultato essere del 52% nel braccio che aveva ricevuto mantenimento con cetuximab (braccio A) e del 41% nel braccio trattato con bevacizumab (braccio B), con un tasso complessivo del 46%.

	Braccio A (n=59)	Braccio B (n=57)	mITT population (n=116)
10 mesi-PFR (%)	52	41	46

Dopo un follow-up mediano di 25.5 mesi si registra una Progression Free Survival (PFS) mediana di 11.2 mesi nel braccio A e di 9.3 mesi nel braccio B.

	Braccio A (n=59)	Braccio B (n=57)	mITT population (n=116)
PFS mediana (mesi)	11.2	9.3	9.6



A: Cetuximab, mantenimento (eventi/N=43/59), PFS mediana: 11.2 mesi

B: Bevacizumab, mantenimento (eventi/N=49/57), PFS mediana: 9.3 mesi

Benché l'endpoint primario non sia stato raggiunto, la terapia di induzione con mFOLFOXIRI e cetuximab seguita da mantenimento con cetuximab o bevacizumab, mostra una promettente efficacia in termini di risposte complete o parziali (Response Rate), di stabilizzazione e di controllo della malattia (Disease Control Rate).

Si registra, infatti, un tasso di risposte complessivo del 69.8%, simile nei due bracci di trattamento (67.8% vs 71.9% nei pazienti randomizzati a cetuximab o a bevacizumab, rispettivamente). Il 3% dei pazienti, inoltre, ha raggiunto una risposta clinica completa durante la terapia (5% vs 2%). Stabilità di malattia è stata ottenuta come miglior risposta nel 18% dei 116 pazienti trattati, in modo sovrapponibile nei due bracci (19% nel braccio A vs 18% nel braccio B) e, complessivamente, la malattia è stata controllata nell'88% dei casi (86% nel braccio A vs 89% nel braccio B). Soltanto in due pazienti per braccio la progressione di malattia (PD) è stata registrata, alle rivalutazioni in corso di trattamento, come la miglior risposta.

Miglior risposta, %	Braccio A (n=59)	Braccio B (n=57)	mITT population (n=116)
Risposta Completa (RC)	5	2	3
Risposta Parziale (RP)	63	70	66
Tasso di risposta (RR)	67.8	71.9	69.8
Malattia Stabile (SD)	19	18	18
Tasso di controllo della malattia	86	89	88
Malattia in Progressione (PD)	3	3	3
Not Assessed	10	7	9

Gli stessi parametri sono stati, inoltre, calcolati nella popolazione effettivamente rivalutata secondo i criteri RECIST (106 pazienti in totale, 53 per ogni braccio). Da questa si rilevano tassi di risposta e di controllo di malattia rispettivamente del 76%, e del 96%.

Miglior risposta, %	Braccio A (n=53)	Braccio B (n=53)	mITT population (n=106)
Risposta Completa (RC)	6	2	4
Risposta Parziale (RP)	70	75	73
Tasso di risposta (RR)	75	77	76

Malattia Stabile (SD)	21	19	20
Tasso di controllo della malattia	96	96	96
Malattia in Progressione (PD)	3	3	3
Not Assessed	4	4	4

Grazie all'attività del trattamento, il 37.9% dei 116 pazienti, basalmente non resecabili, sono stati convertiti a chirurgia secondaria con intento radicale (45.8% vs 29.8% nei bracci che prevedevano cetuximab o bevacizumab, rispettivamente). La resezione è risultata aver asportato totalmente la malattia, con negatività sia macro- che microscopica (R0), nel 27.6% dei casi (32.2% vs 22.8%). Valutando pazienti selezionati per secondarismi a localizzazione soltanto epatica (n=52; 28 nel braccio A e 24 nel braccio B), il tasso di chirurgia secondaria con intento radicale è stata complessivamente del 65.4% (71.4% vs 58.3%) e quello di resezione R0 del 50.0% (53.6% vs 45.8%).

<i>Ogni sede di metastasi, %</i>	Braccio A (n=59)	Braccio B (n=57)	mITT population (n=116)
Chirurgia secondaria con intento radicale	45.8	29.8	37.9
Chirurgia secondaria R0	32.2	22.8	27.6

<i>Metastasi limitate al fegato, %</i>	Braccio A (n=28)	Braccio B (n=24)	Liver-only subgroup (n=52)
Chirurgia secondaria con intento radicale	71.4	58.3	65.4
Chirurgia secondaria R0	53.6	45.8	50.0

Il trattamento di induzione è stato complessivamente ben tollerato. Eventi avversi gravi sono stati registrati nel 30.2% dei pazienti, in particolare, quelli di grado 3-4 più frequenti sono stati la neutropenia (32.8%, a cui si associa anche un 2.6% di neutropenia febbrile), la diarrea (19.0%), il rash cutaneo (18.1%), l'astenia (10.3%) e la stomatite (6.0%).

La mortalità trattamento-correlata è minima (1.7%; un paziente per braccio), mentre si registra il 4.3% di morti precoci, entro i 60 giorni dalla randomizzazione (3 nel braccio A e 2 nel braccio B).

%	Braccio A (n=59)	Braccio B (n=57)	mITT population (n=116)
Eventi avversi gravi	30.5	29.8	30.2
Eventi avversi fatali	3.4	3.5	3.4
Morti trattamento-correlate	1.7	1.7	1.7
Morti precoci (<i>entro 60 giorni dalla randomizzazione</i>)	5.1	3.5	4.3

<i>Eventi avversi G3-4, % di pazienti</i>	Braccio A (n=59)	Braccio B (n=57)	mITT population (n=116)
Nausea	1.7	1.8	1.7
Vomito	3.4	1.8	2.6
Diarrea	20.3	17.5	19.0
Stomatite	6.8	5.3	6.0
Neutropenia	30.5	35.1	32.8
Neutropenia febbrile	3.4	1.8	2.6
Neurotossicità	8.5	1.8	5.2
Astenia	11.9	8.8	10.3
Rash cutaneo	23.7	12.3	18.1
Trombosi venosa	1.7	3.5	2.6
Trombosi arteriosa	1.7	0	0.9

A dimostrazione e a sostegno della buona tollerabilità del regime di induzione FOLFOXIRI più cetuximab presentiamo anche i dati riguardo l'esposizione a questo tipo di terapia: i cicli ritardati sono stati il 13.6%, mentre quelli con dose ridotta il 27.3%.

%	Braccio A (n=59)	Braccio B (n=57)	mITT population (n=116)
Cicli ritardati	13.9	13.2	13.6
Cicli con dose ridotta	31.9	22.6	27.3

3.6 Conclusioni

Quattro mesi di induzione con cetuximab, in combinazione con un regime modificato della tripletta FOLFOXIRI (mFOLFOXIRI), nella prima linea di trattamento di pazienti con metastasi non resecabili da tumore del colon-retto *RAS* e *BRAF* wild-type, seguiti da mantenimento con cetuximab o bevacizumab, non hanno permesso di raggiungere l'endpoint primario dello studio (10-months PFR) in nessuno dei due bracci. Il regime di combinazione intensivo con la tripletta di chemioterapici associata al farmaco anti-EGFR si è comunque dimostrato estremamente attivo.

I risultati, complessivamente, confermano infatti nella più ampia serie attualmente trattata, quanto riportato da altri studi preliminari riguardo l'associazione di tripletta e anti-EGFR, con elevati tassi di risposta e di resezioni secondarie radicali. Il tasso di risposte ottenuto nello studio MACBETH (70%) è, infatti, estremamente elevato, così come la percentuale di pazienti convertiti a resezione delle lesioni secondarie (38% di tutti i pazienti e 65% tra coloro che avevano metastasi a sola localizzazione epatica). Le resezioni radicali (R0) sono risultate rispettivamente del 28% e 50%.

Tali evidenze sembrano pertanto supportare il concetto per cui gli anticorpi anti-EGFR sono in grado di determinare una rapida e significativa riduzione del volume tumorale. Trials randomizzati di tipo prospettico riportano, infatti, che l'aggiunta di cetuximab alla chemioterapia possa aumentare il numero di risposte secondo i criteri RECIST e di conversioni alla chirurgia.^{164,220,234}

I criteri di inclusione dello studio MACBETH prevedevano una selezione accurata dei pazienti in base allo stato mutazionale di *RAS* e *BRAF*. Solo i pazienti *all RAS* e *BRAF* wild-type erano eleggibili, dal momento che mutazioni a carico di questi geni sono state identificate come fattori predittivi negativi di risposta a farmaci anti-EGFR.

Nei pazienti *RAS* e *BRAF* wild-type, nella pratica clinica, la scelta può, quindi, ricadere sia su farmaci anti-angiogenici come il bevacizumab, sia

su farmaci anti-EGFR. Studi di confronto tra questi due trattamenti in pazienti non mutati non hanno raggiunto i loro obiettivi primari di OS e PFS, ma hanno dimostrato una maggior attività degli anti-EGFR su parametri radiologici quali il tasso di risposta, la DoR e l'ETS³¹⁴⁻³¹⁹, risultati anch'essi in linea con quelli forniti dallo studio sopra descritto.

La combinazione di FOLFOXIRI e cetuximab si è dimostrata essere, inoltre, un trattamento sicuro e ben tollerato, tenendo conto delle opportune riduzioni nel dosaggio di 5-FU e irinotecan rispetto al regime di FOLFOXIRI classico, rese necessarie a causa dell'aumentata tossicità riportata in altre esperienze dall'associazione di farmaci anti-EGFR e doppiette²³³ o triplete^{329,331} chemioterapiche contenenti irinotecan, in termini di diarrea di grado 3-4. La frequenza degli eventi avversi è in linea con il profilo di tossicità noto attribuibile ai farmaci utilizzati, con il 18% dei pazienti che ha sviluppato il rash cutaneo tipico del cetuximab e il 32% e 19% dei casi in cui si è riportato neutropenia e diarrea G3-4, rispettivamente, tipiche dei chemioterapici classici. La limitata percentuale di pazienti che ha dovuto ritardare un ciclo di trattamento (14%) o farlo a dose ridotta (27%) costituisce un'altra conferma della sicurezza del regime scelto, così come la minima mortalità trattamento-correlata (1.7%).

La riduzione della durata dell'induzione da 6 mesi ad un periodo più breve (4 mesi), sembra poter essere un'opzione di trattamento altrettanto efficace, diminuendo allo stesso tempo le tossicità chemio-correlate, migliorando la qualità di vita del paziente e lasciando maggiormente spazio alla successiva terapia di mantenimento, tramite cui vengono consolidati i risultati ottenuti. Un approccio dello stesso tipo è previsto in studi di fase II in corso quali TRIBE-2³¹⁰, MOMA³⁰⁹, STEAM³⁵³.

Oltre a valutare attività e sicurezza della triplete mFOLFOXIRI in associazione a cetuximab e la possibilità di ridurre la durata della terapia di induzione a 4 mesi senza comprometterne l'efficacia, lo studio MACBETH ha indagato anche due possibili opzioni nell'ambito del

mantenimento, che prevedevano l'utilizzo di un farmaco biologico tra cetuximab e bevacizumab.

Pur non essendo ancora disponibili i risultati in termini di OS, lo switch a bevacizumab, in seguito a trattamento di induzione di prima linea con chemioterapia e cetuximab, non appare una strategia promettente, meritevole di successive valutazioni. La somministrazione dell'anti-angiogenico in monoterapia non sembrerebbe, infatti, capace di consolidare il risultato ottenuto dall'iniziale fase di induzione.

Bibliografia

1. Torre L.A. et al. Global cancer statistics, 2012. *CA CANCER J CLIN* 2015 Mar; 65(2):87-108.
2. Siegel R.L. et al. Cancer Statistics, 2015. *CA CANCER J CLIN* 2015; Jan-Feb;65(1):5-29.
3. Ferlay J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86
4. Jemal A. et al. Global Cancer Statistics. *CA CANCER J CLIN* 2011;61:69–90
5. Murphy G. et al. Sex disparities in colorectal cancer incidence by anatomic subsite, race and age. *Int. J. Cancer*: 128, 1668–1675 (2011)
6. Berrino F. et al. The EURO CARE study of survival of cancer patients in Europe: aims, current status, strengths and weaknesses. *Eur J Cancer* 37:673-7, 2001
7. Ponz de Leon M. et al. Trend of incidence, subsite distribution and staging of colorectal neoplasms in the 15-year experience of a specialised cancer registry. *Annals of Oncology* 15: 940–946, 2004
8. Schmid D., Leitzmann M.F. Association between physical activity and mortality among breast cancer and colorectal cancer survivors: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Oncology* 25: 1293–1311, 2014
9. Esteban-Jurado C. et al. New genes emerging for colorectal cancer predisposition. *World J Gastroenterol* 2014 February 28; 20(8): 1961-1971
10. Chan D.S. et al. Red and Processed Meat and Colorectal Cancer Incidence: Meta-Analysis of Prospective Studies. *PLoS ONE* 6(6):e20456.
11. Oostindjer M. et al. The role of red and processed meat in colorectal cancer development: a perspective. *Meat Science* 97 (2014) 583–596
12. Kato I. et al. Dietary fatty acids, luminal modifiers, and risk of colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2010 August 15; 127(4): 942–951. doi:10.1002/ijc.25103.
13. Aune D. et al. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ* 2011;343:d6617 doi: 10.1136/bmj.d6617
14. Ben Q. et al. Dietary Fiber Intake Reduces Risk for Colorectal Adenoma: A Meta-analysis. *Gastroenterology* 2014;146:689–699
15. Lee J.E., Chan A.T. Fruit, Vegetables, and Folate: Cultivating the Evidence for Cancer Prevention. *Gastroenterology*. 2011 July ; 141(1): 16–20. doi:10.1053/j.gastro.2011.05.020.
16. Wu Q.J. et al. Cruciferous vegetables intake and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis of observational studies. *Annals of Oncology* 24: 1079–1087, 2013
17. Augustin L.S. et al. Associations of bread and pasta with the risk of cancer of the breast and colorectum. *Annals of Oncology* 24: 3094–3099, 2013

18. Fedirko V. et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose–response meta-analysis of published studies. *Annals of Oncology* 22: 1958–1972, 2011
19. Kushi L.H. et al. Physical Activity for Cancer Prevention Reducing the Risk of Cancer Wit Healthy Food Choices and Physical Activity. *CA Cancer J Clin* 2012;62:30–67.
20. Riondino S. et al. Obesity and colorectal cancer: Role of adipokines in tumor initiation and progression. *World J Gastroenterol* 2014 May 14; 20(18): 5177-5190
21. Aleksandrova K, Nimptsch K, Pischon T. Influence of Obesity and Related Metabolic Alterations on Colorectal Cancer Risk. *Curr Nutr Rep* (2013) 2:1–9
22. Walter V. et al. Smoking and survival of colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis. *Annals of Oncology* 25: 1517–1525, 2014
23. Giovannucci E., Martinez M.E. Tobacco, colorectal cancer, and adenomas: a review of the evidence. *J Natl Cancer Inst* 88:1717-30, 1996
24. Michael D. et al. Risk of Cancer in Patients With Inflammatory Bowel Diseases: A Nationwide Population-based Cohort Study With 30 Years of Follow-up Evaluation. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2014;12:265–273
25. Kim E.R, Chang D.K. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: The risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. *World J Gastroenterol* 2014 August 7; 20(29): 9872-9881
26. Valle L. Genetic predisposition to colorectal cancer: Where we stand and future perspectives. *World J Gastroenterol* 2014 August 7; 20(29): 9828-9849
27. Zhang K et al. Genetic variations in colorectal cancer risk and clinical outcome. *World J Gastroenterol* 2014 April 21; 20(15): 4167-4177
28. Lynch H.T., Lynch J. Lynch syndrome: genetics, natural history, genetic counseling, and prevention. *J Clin Oncol* 18:19S-31S, 2000
29. Spirio LN et al. Alleles of APC modulate the frequency and classes of mutations that lead to colon polyps. *Nat Genet* 20:385-8, 1998
30. Stoffel E.M. et al. Hereditary Colorectal Cancer Syndromes: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement of the Familial Risk–Colorectal Cancer: European Society for Medical Oncology Clinical Practice Guidelines. *J Clin Oncol* 33:209-217 JANUARY 10 2015
31. Juhn E., Khachemoune A. Gardner syndrome: skin manifestations, differential diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol* 11:117-22, 2010
32. Hamilton S.R. et al. The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med* 332:839-47, 1995
33. Debinski H.S. et al. Colorectal polyp counts and cancer risk in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 110:1028-1030, 1996
34. Knudsen AL et al. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature. *Fam Cancer* 2:43-55, 2003
35. Beggs AD et al. Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management. *Gut* 59:975-86, 2010

36. Ciardiello F. et al. *Oncologia Medica*; Idelson Gnocchi, 2012
37. Flossmann E., Rothwell P.M. Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomised and observational studies. *Lancet* 2007; 369: 1603–13.
38. Rothwell P.M. et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet* 2010 Nov 20;376(9754):1741-50.
39. Bosetti C. et al. Aspirin and cancer risk: a quantitative review to 2011. *Annals of Oncology* 23: 1403–1415, 2012
40. Tsao A.S. et al. Chemoprevention of Cancer. *CA Cancer J Clin* 2004;54:150–180
41. Barton MK et al. Daily Aspirin Reduces Colorectal Cancer Incidence in Patients With Lynch Syndrome. *CA Cancer J Clin* 2012 May-Jun;62(3):143-4
42. Smith R.A. et al. Cancer Screening in the United States, 2014. A Review of Current American Cancer Society Guidelines and Current Issues in Cancer Screening. *CA CANCER J CLIN* 2014;64:30–51
43. Hewitson P. et al. Screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, Hemoccult. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; 1: CD001216.
44. Sinatra MA et al. Interference of plant peroxidases with guaiac-based fecal occult blood tests is avoidable. *Clin Chem* 1999; 45: 123–126.
45. Garborg K. et al. Current status of screening for colorectal cancer. *Annals of Oncology* 24: 1963–1972, 2013
46. Whitlock E.P. et al. Screening for colorectal cancer: a targeted, updated systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2008; 149: 638–658.
47. Schwartz S. et al. The "HemoQuant" test: a specific and quantitative determination of heme (hemoglobin) in feces and other materials. *Clin Chem* 29:2061-7, 1983
48. Jin Y.M. et al. "BRAF, K-ras and BAT26 mutations in colorectal polyps and stool". *World J. Gastroenterol.* 12 (32): 5148–52.
49. Cravo M. et al. "BAT-26 identifies sporadic colorectal cancers with mutator phenotype: a correlative study with clinico-pathological features and mutations in mismatch repair genes". *J Pathol.* 1999 Jul;188(3):252-7
50. Mandel JS, Bond JH, Church TR et al. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. Minnesota Colon Cancer Control Study. *N Engl J Med* 1993; 328: 1365-1371.
51. Hardcastle JD, Chamberlain JO, Robinson MH et al. Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. *Lancet* 1996; 348: 1472-1477.
52. Kronborg O, Fenger C, Olsen J et al. Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occultblood test. *Lancet* 1996; 348: 1467-1471.

53. Kewenter J, Brevinge H, Engaras B et al. Results of screening, rescreening, and follow-up in a prospective randomized study for detection of colorectal cancer by fecal occult blood testing. Results for 68,308 subjects. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29: 468-473.
54. Church T.R. Screening for Colorectal Cancer--Which Strategy is the Best? *J Natl Cancer Inst*, 2011
55. Osservatorio nazionale screening: www.osservatorionazionale screening.it.
56. <http://www.aiom.it/professionisti/documenti-scientifici/linee-guida/colorectto/1%2C723%2C1%2C>
57. Kumar V. et al. Robbins and Cotran pathologic basis of disease (ed 8th). Philadelphia, Pa., Elsevier Saunders, 2010
58. Jass J.R. et al. Histological typing of intestinal tumours (ed 2nd). Berlin ; New York, Springer-Verlag, 1989
59. Gagliardi G. et al. New grade-related prognostic variable for rectal cancer. *Br J Surg* 82:599-602, 1995
60. Kinzler K.W. et al. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87:159, 1996
61. Jass J.R. Pathogenesis of colorectal cancer. *Surg Clin N Am* 82:891, 2002
62. Peifer M. et al. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* 287:1606-9, 2000
63. Mann B. et al. Target genes of beta-catenin-T cellfactor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1603-8, 1999
64. Smith A.J. et al. Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res* 54:5527-30, 1994
65. Taketo M.M., Takaku K. Gastro-intestinal tumorigenesis in Smad4 mutant mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:147-57, 2000
66. Kinzler KW, Vogelstein B: Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87:159-70, 1996
67. Peltomaki P: Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* 10:735-40, 2001
68. Abdel-Rahman WM, Mecklin JP, Peltomaki P: The genetics of HNPCC: application to diagnosis and screening. *Crit Rev Oncol Hematol* 58:208-20, 2006
69. Abeloff M.D. *Abeloff's clinical oncology* (ed 4th). Philadelphia, PA, Churchill Livingstone/Elsevier, 2008
70. Glenn F., McSherry C.K. Obstruction and perforation in colo-rectal cancer. *Ann Surg.* 1971 Jun; 173(6): 983-992
71. Cunningham D. et al. Colorectal cancer. *Lancet* 375:1030-47, 2010
72. Mainenti P.P. et al Added value of CT colonography after a positive conventional colonoscopy: impact on treatment strategy. *Abdom Imaging* 2005; 30: 42-47 2005
73. Copel L. et al. CT colonography in 546 patients with incomplete colonoscopy. *Radiology* 2007; 244: 471-78.

74. Morrin M.M. et al. Endoluminal CT colonography after an incomplete endoscopic colonoscopy. *AJR Am J Roentgenol* 1999; 172: 913–18.
75. Furukawa H. et al. Positron emission tomography scanning is not superior to whole body multidetector helical computed tomography in the preoperative staging of colorectal cancer. *Gut* 2006; 55: 1007–11.
76. Brown G. et al. Preoperative assessment of prognostic factors in rectal cancer using high-resolution magnetic resonance imaging. *Br J Surg* 2003; 90: 355–64.
77. Bipat S. et al. Colorectal liver metastases: CT, MR imaging, and PET for diagnosis—metaanalysis. *Radiology* 2005; 237: 123–31.
78. Truant S. et al. Prospective evaluation of the impact of [18F]fl uoro-2-deoxy-Dglucose positron emission tomography of resectable colorectal liver metastases. *Br J Surg* 2005; 92: 362–69.
79. Gonzalez-Moreno S. et al. Imaging of peritoneal carcinomatosis. *Cancer J* 2009; 15: 184–89.
80. Bertagnolli M.M. et al. Surgical aspects of colorectal carcinoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 1997; 11: p. 655-677.
81. Turnbull R.B. Jr. et al. Cancer of the colon: the influence of the no-touch isolation technic on survival rates. *CA Cancer J Clin.*, 1968; 18(2): p. 82-87.
82. Enker W.E. et al. Enhanced survival of patients with colon and rectal cancer is based upon wide anatomic resection. *Annals of Surgery*, 1979; 190(3): p. 350-360.
83. Wiggers T. et al. No-touch isolation technique in colon cancer: a controlled prospective trial. *British Journal of Surgery*, 1988; 75(5): p. 409-415.
84. Bleiberg H., N. Kemeny, P. Rougier, et al., *Colorectal cancer: a guide to therapy*. Martin Dunitz, London 2002: p. 173-84.
85. Heald R.J. et al. Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet*, 1986; 1(8496): p. 1479-1482.
86. Heald R.J. et al. Rectal cancer: the Basingstoke experience of total mesorectal excision, 1978-1997. *Arch Surg.*, 1998; 133(8): p. 894-899.
87. Dionigi R. et al. *Chirurgia-Basi teoriche e Chirurgia generale - Chirurgia specialistica*, V ed., ed. E.-Masson, 2011; *Il Chirurgia Generale* (8)
88. Day A.R. et al. Time to adjuvant chemotherapy following colorectal cancer resection is associated with an improved survival. *Colorectal Dis.* 2014 May;16(5):368-72.
89. Jeong W.K. et al. Oncologic outcomes of early adjuvant chemotherapy initiation in patients with stage III colon cancer. . *Ann Surg Treat Res.* 2015 Sep;89(3):124-30.
90. Hung-Hsin Lin et al. The role of adjuvant chemotherapy in stage II colorectal cancer patients. *International Journal of Colorectal Disease*, October 2014, Volume 29, Issue 10, pp 1237-1243
91. Benson A.B. et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3408-3419.

92. Kohne C.H. Should adjuvant chemotherapy become standard treatment for patients with stage II colon cancer? Against the proposal. *Lancet Oncol* 2006; 7: 515-517.
93. Van Laarhoven H.W. et al. To treat or not to treat: who should decide? *Oncologist* 19: 433- 436.
94. Sargent D.J. et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 28: 3219-3226.
95. Gill S. et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *Journal of Clinical Oncology*, 2004; 22(10): p. 1797-1806.
96. Moertel C.G. Trials, errors and glimmers of success in the surgical adjuvant treatment of colorectal cancer, Levin B (ed): *Gastrointestinal Cancer*. Austin, TX, University of Texas Press, 1988, pp 3-17
97. Buyse M. et al. Adjuvant therapy of colorectal cancer. Why we still don't know. *JAMA* 259:3571-3578, 1988 3.
98. Wolmark N. et al. Postoperative adjuvant chemotherapy or BCG for colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 1:30-36, 1988
99. Moertel CG: Surgical adjuvant treatment of large bowel cancer. *J Clin Oncol* 6:934-939, 1988
100. Mansour E. et al. Lack of effectiveness of 5-FU + methyl CCNU as compared to 5-FU for adjuvant therapy in colon cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 8:115, 1989
101. Panetti FJ, Goodman PJ, Costanzi JJ, et al: Adjuvant therapy in large bowel adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 6:947-954, 1988
102. Gastrointestinal Tumor Study Group: Adjuvant therapy of colon cancer. *N Engl J Med* 310:737-743, 1984.
103. Souter R.G. et al. A trial of non-specific immunotherapy Using systemic *C. parvum* treated patients with dukes B and C colorectal cancer. *Br J Cancer* 45:506-512, 1982
104. Verhaegen H. et al. Levamisole therapy in patients with colorectal cancer, in Terry WD, Rosenberg SA (eds): *Immunotherapy of Human Cancer*, New York, NY, Elsevier, 1982, pp 225-229
105. Chirigos M.A., Amery W.K. Combined levamisole therapy: An overview of its protective effects, in *Immunotherapy of Human Cancer*. New York, NY, Raven, 1978, pp 181-195
106. Renoux G. The general immunopharmacology of levamisole. *Drugs* 20:89-99, 1980
107. Laurie J.A. et al. Surgical Adjuvant Therapy of Large-Bowel Carcinoma: An Evaluation of Levamisole and the Combination of Levamisole and Fluorouracil. *J Clin Oncol* 7:1447-1456. © 1989 by American Society of Clinical Oncology

108. Moertel C.G. et al. Intergroup study of fluorouracil plus levamisole as adjuvant therapy for stage II/Dukes' B2 colon cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 1995; 13(12): p. 2936-2943.
109. Moertel C.G. et al. Fluorouracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: A final report. *Ann Intern Med* 122:321-326, 1995
110. Moertel C.G. et al. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon cancer. *N Engl J Med* 322:352-358, 1990
111. O'Connell M.J. et al. Prospectively randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy in patients with high-risk colon cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 1998; 16(1): p. 295-300.
112. Haller D.G. 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*, 2005; 23(34): p. 8671-8678.
113. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of colon cancer trials (IMPACT) investigators. *Lancet*, 1995; p. 345-939.
114. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in B2 colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of B2 Colon Cancer Trials (IMPACT B2) Investigators. *J Clin Oncol*. 1999 May;17(5):1356-63.
115. Poplin E.A. 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.
116. Schmoll H.J. et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol*. 2012; 23: 2479–2516
117. André T. et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med*. 2004; 350: 2343–2351
118. André T. et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol*. 2009;27: 3109–3116
119. Kuebler J.P. 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. *J Clin Oncol*. 2007; 25: 2198–2204
120. Haller D.G. et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 1465–1471

121. Yothers G. et al. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses. *J Clin Oncol*. 2011; 29:3768–3774
122. Schmoll H.J. et al. Effect of adjuvant capecitabine or fluorouracil, with or without oxaliplatin, on survival outcomes in stage III colon cancer and the effect of oxaliplatin on post-relapse survival: a pooled analysis of individual patient data from four randomised controlled trials. *Lancet Oncol* 2014; 15: 1481–92
123. Twelves C. et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med*. 2005; 352: 2696–2704
124. Yothers G.A. et al. Fluorouracil and leucovorin (Lv) with or without oxaliplatin (Ox) for adjuvant treatment of stage II and III colon cancer: long-term follow-up of NSABP C-07 with survival analysis. American Society for Clinical Oncology Gastrointestinal Cancers Symposium; Orlando, FL, USA; Jan 22–24, 2010. Abstract 401
125. Miwa M. et al. Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1274–81.
126. Haller D.G. et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol* 29: 1465-1471
127. Sargent D.J. et al. A pooled analysis of adjuvant chemotherapy for resected colon cancer in elderly patients. *N Engl J Med*. 2001 Oct 11;345(15):1091-7.
128. Saltz L.B. et al. Irinotecan fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: results of CALGB 89803. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3456-3461.
129. Van Cutsem E. 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. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3117-3125.
130. Ychou M. et al. A phase III randomised trial of LV5FU2 + irinotecan versus LV5FU2 alone in adjuvant high-risk colon cancer (FNCLCC Accord02/FFCD9802). *Ann Oncol* 2009; 20: 674-680
131. De Gramont A. et al. Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy as adjuvant treatment for colon cancer (AVANT): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 13: 1225-1233.
132. Allegra C.J. et al. Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. *J Clin Oncol* 29: 11-16.
133. Alberts S.R. 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* 307: 1383- 1393

134. Custodio A. et al. Pharmacogenetic Predictors of Outcome in Patients with Stage II and III Colon Cancer Treated with Oxaliplatin and Fluoropyrimidine-Based Adjuvant Chemotherapy. *Mol Cancer Ther* September 2014;13: 2226
135. Custodio A. et al. Pharmacogenetic predictors of severe peripheral neuropathy in colon cancer patients treated with oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy: a GEMCADgroup study. *Ann Oncol.* 2014 Feb;25(2):398-403.
136. Lee A.M. et al. DPYD variants as predictors of 5-fluorouracil toxicity in adjuvant colon cancer treatment (NCCTG N0147). *J Natl Cancer Inst.* 2014 Nov 7;106(12). pii: dju298. doi: 10.1093/jnci/dju298. Print 2014 Dec.
137. Sinicrope F.A. et al. Body mass index at diagnosis and survival among colon cancer patients enrolled in clinical trials of adjuvant chemotherapy. *Cancer.* 2013 Apr 15;119(8):1528-36.
138. Phipps A.I. et al. Associations between cigarette smoking status and colon cancer prognosis among participants in North Central Cancer Treatment Group Phase III Trial N0147. *J Clin Oncol* 31: 2016-2023.
139. Ludmir E.B. et al. Role of Adjuvant Radiotherapy in Locally Advanced Colonic Carcinoma in the Modern Chemotherapy Era. *Ann Surg Oncol.* 2015 Oct 19
140. Barbacid M. Ras genes. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:779-827.
141. Bourne H.R., Kenyon C. Ras proteins. Some signal developments. *Nature.* 1990 Dec 20-27;348(6303):678-9.
142. Boguski M.S., McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature.* 1993 Dec 16;366(6456):643-54.
143. Quilliam L.A. et al. Guanine nucleotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins. *Bioessays.* 1995 May;17(5):395-404.
144. Satoh T, Kaziro Y. Ras in signal transduction. *Semin Cancer Biol.* 1992 Aug;3(4):169-77.
145. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 3, 11-22 (January 2003)
146. Bos J.L. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989 Sep 1;49(17):4682-9.
147. Williams L.T. Missing links between receptors and Ras. *Curr Biol.* 1992 Nov;2(11):601-3.
148. Schlessinger J. How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci.* 1993 Aug;18(8):273-5.
149. Moodie S.A., Wolfman A. The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. *Trends Genet.* 1994 Feb;10(2):44-8.
150. Crews C.M. et al. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science.* 1992 Oct 16;258(5081):478-80.

151. Marais R. et al. The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell*. 1993 Apr 23;73(2):381-93.
152. www.oregonstate.edu/instruct/bb331/lecture14/ras3.html
153. Malumbres M., Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 2003;3:459–65.
154. Bos J.L. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49:4682–9.
155. Kirsten W.H. Properties of a murine sarcoma virus. *Bibl Haematol* 1970: 246–9.
156. Harvey J.J. An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. *Nature* 1964;204:1104–5.
157. Cooper G.M. Cellular transforming genes. *Science* 1982;217:801–6.
158. Shimizu K. et al. Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:383–7.
159. Conlin A. et al. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut* 2005;54: 1283–6.
160. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:11–22.
161. <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/overview?ln=KRAS>.
162. Fernandez-Medarde A., Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer* 2011;2: 344–58.
163. Smith C.G. et al. Somatic profiling of the epidermal growth factor receptor pathway in tumors from patients with advanced colorectal cancer treated with chemotherapy ± cetuximab. *Clin Cancer Res* 2013;19:4104–13.
164. Van Cutsem E. 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. *J Clin Oncol* 2011;29:2011–19.
165. Bokemeyer C. et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol* 2011;22:1535–46.
166. Lievre A. et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006;66:3992–5.
167. Amado R.G. et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:1626–34.
168. Vale C.L. et al. Does antiEGFR therapy improve outcome in advanced colorectal cancer? A systematic review and metaanalysis. *Cancer Treat Rev* 2012;38:618–25.
169. Loupakis F. et al. Clinical impact of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: meta-analytical estimation and implications for therapeutic strategies. *Cancer* 2012;118:1523–32.

170. Loupakis F. 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. *Br J Cancer* 2009;101:715–21.
171. Tran B. et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2011;117:4623–32.
172. Cejas P. et al. KRAS mutations in primary colorectal cancer tumors and related metastases: a potential role in prediction of lung metastasis. *PLoS One* 2009;4:e8199.
173. Tie J. et al. KRAS mutation is associated with lung metastasis in patients with curatively resected colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17:1122–30.
174. Pendlebury S. et al. A Trial of Adjuvant Therapy in Colorectal Cancer: The VICTOR Trial *Clinical Colorectal Cancer* , Volume 3 , Issue 1 , 58 – 60
175. Andreyev H.J. et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst.* 1998 May 6;90(9):675-84.
176. Andreyev H.J. et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 2001; 85:692–6.
177. Richman S.D. et al. KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: results from the MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol* 2009;27:5931–7
178. Ogino S. et al. KRAS mutation in stage III colon cancer and clinical outcome following intergroup trial CALGB 89803. *Clin Cancer Res* 2009;15:7322–9.
179. Phipps A.I. et al. KRAS-mutation status in relation to colorectal cancer survival: the joint impact of correlated tumour markers. *British Journal of Cancer*, 2013: 108(8): p. 1757-1764.
180. Roth A.D. et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 2010;28:466–74.
181. Haigis K.M. et al. Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nature Genetics*, 2008; 40(5): p. 600-608
182. Schirripa M. et al. Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer. *Int. J. Cancer*: 136, 83-90 (2015).
183. Davies H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417:949–54.
184. Saridaki Z. et al. BRAF mutations, microsatellite instability status and cyclin D1 expression predict metastatic colorectal patients' outcome. *Br J Cancer* 2010;102: 1762–8.

185. Souglakos J. et al. Prognostic and predictive value of common mutations for treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 101:465–72.
186. Yokota T. et al. BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer. *Br J Cancer* 2011; 104:856–62.
187. Tie J. et al. Optimizing targeted therapeutic development: analysis of a colorectal cancer patient population with the BRAF(V600E) mutation. *Int J Cancer* 2011;128: 2075–84.
188. Sorbye H. et al. High BRAF Mutation Frequency and Marked Survival Differences in Subgroups According to KRAS/BRAF Mutation Status and Tumor Tissue Availability in a Prospective Population-Based Metastatic Colorectal Cancer Cohort. *PLoS One*. 2015 Jun 29;10(6):e0131046.
189. Loupakis F. et al. Clinico-pathological nomogram for predicting BRAF mutational status of metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015 Nov 17.
190. Cremolini C. et al. BRAF codons 594 and 596 mutations identify a new molecular subtype of metastatic colorectal cancer at favorable prognosis. *Ann Oncol*. 2015 Oct;26(10):2092-7.
191. De Roock W. et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 2010;11:753–62.
192. Di Nicolantonio F. et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:5705–12.
193. Seymour M.T. 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. *Lancet Oncol* 2013;14:749– 59.
194. Karapetis, C.S. 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. *Clin Cancer Res* 20, 744-53 (2014).
195. Peeters, M. et al. Massively parallel tumor multigene sequencing to evaluate response to panitumumab in a randomized phase III study of metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 19, 1902-12 (2013).
196. Pietrantonio F. et al. Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2015 Mar;51(5):587-94.

197. Rowland A. et al. Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015 Jun 9;112(12):1888-94. doi: 10.1038/bjc.2015.173. Epub 2015 May 19.
198. Masi G. et al. Bevacizumab with FOLFOXIRI (irinotecan, oxaliplatin, fluorouracil, and folinate) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2010 Sep;11(9):845-52.
199. Loupakis F. et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab as first-line treatment in BRAF mutant metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2014 Jan;50(1):57-63.
200. Cremolini C. 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. *Lancet Oncol*. 2015 Oct;16(13):1306-15.
201. Schirripa M. et al. BRAF and RAS mutations as prognostic factors in metastatic colorectal cancer patients undergoing liver resection. *Br J Cancer*. 2015 Jun 9;112(12):1921-8.
202. Yaeger R. et al. BRAF mutation predicts for poor outcomes after metastasectomy in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2014 Aug 1;120(15):2316-24.
203. Kopetz S. et al. Phase II Pilot Study of Vemurafenib in Patients With Metastatic BRAF-Mutated Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2015 Dec 1;33(34):4032-8.
204. Prahallad A. et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature*. 2012 Jan 26;483(7387):100-3.
205. Hyman D.M. et al. Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations. *N Engl J Med*. 2015 Aug 20;373(8):726-36.
206. Bronte G. et al. New findings on primary and acquired resistance to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer: do all roads lead to RAS? *Oncotarget*. 2015 Sep 22;6(28):24780-96.
207. Valtorta E. et al. Assessment of a HER2 scoring system for colorectal cancer: results from a validation study. *Mod Pathol*. 2015 Nov;28(11):1481-91.
208. Amatu A. et al. Promoter CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme MGMT predicts clinical response to dacarbazine in a phase II study for metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2013 Apr 15;19(8):2265-72.
209. Le D.T. et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015 Jun 25;372(26):2509-20.

210. Mitry E. et al. Adjuvant chemotherapy after potentially curative resection of metastases from colorectal cancer: a pooled analysis of two randomized trials. *J Clin Oncol* 2008;26:4906-11.
211. Ychou M. et al. A randomized phase III study comparing adjuvant 5-fluorouracil/folinic acid with FOLFIRI in patients following complete resection of liver metastases from colorectal cancer. *Ann Oncol* 2009;20:1964-70.
212. Gruenberger B. et al. Importance of response to neoadjuvant chemotherapy in potentially curable colorectal cancer liver metastases. *BMC Cancer*. 2008 Apr 25;8:120.
213. Nordlinger B. et al. Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *Lancet* 2008;371:1007-16.
214. Nordlinger B. et al. Does chemotherapy prior to liver resection increase the potential for cure in patients with metastatic colorectal cancer? A report from the European Colorectal Metastases Treatment Group. *Eur J Cancer* 2007;43:2037-45.
215. Nordlinger B. et al. Perioperative FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC 40983): long-term results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013;14:1208-15.
216. Sorbye H. et al. EORTC Gastro-Intestinal Tract Cancer Group; Cancer Research UK (CRUK); Arbeitsgruppe Lebermetastasen und-tumoren in der Chirurgischen Arbeitsgemeinschaft Onkologie (ALM-CAO); Australasian Gastro-Intestinal Trials Group (AGITG); Fédération Francophone de Cancérologie Digestive (FFCD). Predictive factors for the benefit of perioperative FOLFOX for resectable liver metastasis in colorectal cancer patients (EORTC Intergroup Trial 40983). *Ann Surg*. 2012 Mar;255(3):534-9.
217. Nigri G. et al. Neoadjuvant chemotherapy for resectable colorectal liver metastases: What is the evidence? Results of a systematic review of comparative studies. *The Surgeon* , Volume 13 , Issue 2 , 83 – 90
218. Tanis E. et al. Prognostic impact of immune response in resectable colorectal liver metastases treated by surgery alone or surgery with perioperative FOLFOX in the randomised EORTC study 40983. *Eur J Cancer*. 2015 Nov;51(17):2708-17.
219. Primrose J. Systemic chemotherapy with or without cetuximab in patients with resectable colorectal liver metastasis: the New EPOC randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2014 May;15(6):601-11.
220. Folprecht G. et al. Neoadjuvant treatment of unresectable colorectal liver metastases: correlation between tumour response and resection rates. *Ann Oncol*. 2005 Aug;16(8):1311-9.

221. Giacchetti S. et al. Long-term survival of patients with unresectable colorectal cancer liver metastases following infusional chemotherapy with 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin and surgery. *Ann Oncol*1999; 10: 663–669.
222. Scheele J. et al. Resection of colorectal liver metastases. *World J Surg*1995; 19: 59–71.
223. Fong Y. et al. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg*1999; 230: 309–318.
224. Nordlinger B. et al. Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver. A prognostic scoring system to improve case selection, based on 1568 patients. *Association Francaise de Chirurgie. Cancer*1996;77: 1254–1262.
225. Figueras J. et al. Resection rate and effect of postoperative chemotherapy on survival after surgery for colorectal liver metastases. *Br J Surg*2001; 88: 980–985
226. Quenet F. et al. Resection of previously unresectable liver metastases from colorectal cancer (LMCRC) after chemotherapy (CT) with CPT-11/L-OHP/LV5FU (Folfinirox): A prospective phase II trial. *Proc Am Soc Clin Oncol*2004; 23: (Abstr 3613).
227. Tabernero J. et al. An international phase II study of cetuximab in combination with oxaliplatin/5-fluorouracil (5-FU)/folinic acid (FA) (FOLFOX-4) in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (CRC) expressing Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). Preliminary results. *Proc Am Soc Clin Oncol*2004; 23: (Abstr 3512).
228. Folprecht G. et al. Cetuximab/irinotecan/high-dose-5-fluorouracil/leucovorin (HD-5-FU/LV) in the first-line therapy of metastatic colorectal cancer (CRC). *Proc Gastrointest Canc Symp (ASCO/AGA/ASTRO/SSO)*2004;1: (Abstr 283).
229. Tournigand C. et al. FOLFIRI Followed by FOLFOX6 or the Reverse Sequence in Advanced Colorectal Cancer: A Randomized GERCOR Study. *J Clin Oncol*2004; 22: 229–237.
230. Bismuth H. et al. Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg*1996; 224: 509–520.
231. Falcone A. 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. *J Clin Oncol.* 2007 May 1;25(13):1670-6.
232. Masi G. et al. Long-term outcome of initially unresectable metastatic colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil/leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) followed by radical surgery of metastases. *Ann Surg.* 2009 Mar;249(3):420-5.

233. Van Cutsem E. et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009 Apr 2;360(14):1408-17.
234. Ye L.C. et al. Randomized controlled trial of cetuximab plus chemotherapy for patients with KRAS wild-type unresectable colorectal liver-limited metastases. *J Clin Oncol.* 2013 Jun 1;31(16):1931-8.
235. Scappaticci F. et al. Analysis of wound healing and bleeding post-surgery in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab. *Proc Gastrointest Canc Symp (ASCO/AGA/ASTRO/SSO)2004; 1: (Abstr 235).*
236. Gruenberger T. et al. Bevacizumab plus mFOLFOX-6 or FOLFOXIRI in patients with initially unresectable liver metastases from colorectal cancer: the OLIVIA multinational randomised phase II trial. *Ann Oncol.* 2015 Apr;26(4):702-8.
237. Gruenberger T. et al. Neoadjuvant chemotherapy for resectable colorectal cancer liver metastases: Impact on magnitude of liver resection and survival. *Proc Am Soc Clin Oncol2004; 23: (Abstr 3598).*
238. Adam R. et al. Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy: a model to predict long-term survival. *Ann Surg2004; 240: 644–657*
239. Rivoire M. et al. Combination of neoadjuvant chemotherapy with cryotherapy and surgical resection for the treatment of unresectable liver metastases from colorectal carcinoma. *Cancer2002; 95: 2283–2292.*
240. Grothey A. et al. Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment. *J Clin Oncol 22:1209-1214,2004*
241. 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. *J Clin Oncol.* 2005 Dec 20;23(36):9441-2.
242. De Gramont A. et al. OPTIMOX study: FOLFOX7/LV5FU2 compared to FOLFOX4 in patients with advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol 22:14S, 2004 (abstr 3525).*
243. Hurwitz H. et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med 350:2335-2342, 2004.*
244. Pitot H.C. et al. N9841: A randomized phase III equivalence trial of irinotecan (CPT-11) versus oxaliplatin/5-fluorouracil (5FU)/leucovorin (FOLFOX4) in patients (pts) with advanced colorectal cancer (CRC) previously treated with 5FU. *J Clin Oncol 23:16S, 2005 (abstr 3506).*

245. Seymour M.T., Group UNCCS. Fluorouracil, oxaliplatin and CPT-11 (irinotecan), use and sequencing (MRC FOCUS): A 2135-patient randomized trial in advanced colorectal cancer (ACRC). *J Clin Oncol* 23:16S, 2005 (abstr 3518).
246. Sheithauer W. et al. Randomized comparison of combination chemotherapy plus supportive care with supportive care alone in patients with metastatic colorectal cancer. *Br Med J* 1993, 306, 752±755.
247. Kopetz S. et al. Improved survival in metastatic colorectal cancer is associated with adoption of hepatic resection and improved chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2009 Aug 1;27(22):3677-83.
248. Van Cutsem E. et al. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 25 Suppl 3, iii1-9 (2014)
249. Cunningham D. et al. Bevacizumab plus capecitabine versus capecitabine alone in elderly patients with previously untreated metastatic colorectal cancer (AVEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 14, 1077-85 (2013).
250. Loupakis, F. et al. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 371, 1609-18 (2014).
251. Duschinsky R. et al. Synthesis of 5-Fluoropyrimidines. *J. Amer. Chem. SOC.* 7945594560. 1957
252. Heidelberger, C., et al.: Fluorinated pyrimidines, a new class of tumor inhibitory compounds. *Nature* 179:663466, 1957.
253. Lahiri S.R. et al. Treatment of metastatic colorectal carcinoma with 5-fluorouracil by mouth. *Cancer*. 1971 Oct;28(4):902-6.
254. Hahn R.G. et al. A double-blind comparison of intensive course 5-fluorouracil by oral vs. intravenous route in the treatment of colorectal carcinoma. *Cancer*. 1975 Apr;35(4):1031-5.
255. Saltz L.B. et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *The New England journal of medicine*. 2000; 343(13): 905-14.
256. Douillard J.Y. et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet*. 2000; 355(9209): 1041-7.
257. Giacchetti S. et al. Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2000; 18(1): 136-47.

258. De Gramont A. et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2000; 18: p. 2938–2947
259. Falcone A. 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.
260. Van Cutsem E. 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.
261. Arkenau H.T. 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*, 2008; 26(36): p. 5910-5917.
262. Köhne C.H. Irinotecan combine switch infusione 5-fluorurati/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*, 2008; 19(5): p. 920-926.
263. Fuchs C.S. et al. Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results from the BICC-C Study. *Journal of Clinical Oncology*, 2007; 25(30): p. 4779-4786.
264. Colucci 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.
265. Mans D.R. et al. Sequence-dependent growth inhibition and DNA damage formation by the irinotecan-5-fluorouracil combination in human colon carcinoma cell lines. *Eur J Cancer* 35, 1851-61 (1999).
266. Raymond E. et al. Antitumor activity of oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor AG337 in human colon, breast and ovarian cancers. *Anticancer Drugs* 8, 876-85 (1997).
267. Souglakos J. et al. Triplet combination with irinotecan plus oxaliplatin plus continuous-infusion fluorouracil and leucovorin as first-line treatment in metastatic colorectal cancer: a multicenter phase II trial. *J Clin Oncol* 20, 2651-7 (2002).
268. Souglakos, J. 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). *Br J Cancer* 94, 798-805 (2006).

269. Golfinopoulos V. et al. Survival and disease-progression benefits with treatment regimens for advanced colorectal cancer: a meta-analysis. *Lancet Oncol* 8, 898-911 (2007).
270. Seymour M.T. et al. Different strategies of sequential and combination chemotherapy for patients with poor prognosis advanced colorectal cancer (MRC FOCUS): a randomised controlled trial. *Lancet* 370, 143-52 (2007).
271. Koopman M. et al. Sequential versus combination chemotherapy with capecitabine, irinotecan, and oxaliplatin in advanced colorectal cancer (CAIRO): a phase III randomised controlled trial. *Lancet* 370, 135-42 (2007).
272. Ducreux, M. et al. Sequential versus combination chemotherapy for the treatment of advanced colorectal cancer (FFCD 2000-05): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 12, 1032-44 (2011).
273. O'Neil B.H., Goldberg R.M. Innovations in chemotherapy for metastatic colorectal cancer: an update of recent clinical trials. *Oncologist* 13, 1074-83 (2008).
274. Cremolini C. et al. First-line chemotherapy for mCRC—a review and evidence-based algorithm. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015 Oct;12(10):607-19.
275. Fidler I.J., Ellis L.M. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell*. 1994;79:185–8.
276. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971;285(21):1182–6.
277. Ferrara N. et al. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9(6):669–76.
278. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol*. 2001;280(6):C1358–66.
279. Nagy J.A. et al. VEGF-A induces angiogenesis, arteriogenesis, lymphangiogenesis, and vascular malformations. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2002;67:227–37.
280. Nagy J.A. et al. VEGF-A(164/165) and PlGF: roles in angiogenesis and arteriogenesis. *Trends Cardiovasc Med*. 2003;13(5):169–75.
281. Dvorak H.F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*. 2002;20(21):4368–80.
282. Shinkai A. et al. Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-containing receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 1998;273(47):31283–8.
283. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Func*. 2001;26(1):25–35.
284. Zafirellis K. et al. Prognostic significance of VEGF expression evaluated by quantitative immunohistochemical analysis in colorectal cancer. *J Surg Res*. 2008;147(1):99–107.

285. Takebayashi Y. et al. Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. *Cancer*. 1996;78(2):226–31.
286. Takebayashi Y. et al. . Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase, in human colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst*.1996;88(16):1110–7.
287. Melnyk O. et al. Vascular endothelial growth factor promotes tumor dissemination by a mechanism distinct from its effect on primary tumor growth. *Cancer Res*. 1996;56(4):921–4.
288. Kim K.J. et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*. 1993;362(6423):841–4.
289. Van Cutsem E. et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012; 30(28): 3499-506.
290. Garcia-Carbonero R. et al. An open-label phase II study evaluating the safety and efficacy of ramucirumab combined with mFOLFOX-6 as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. *Oncologist*. 2014 Apr;19(4):350-1.
291. Goel G., Sun W. Ramucirumab, another anti-angiogenic agent for metastatic colorectal cancer in second-line setting--its impact on clinical practice. *J Hematol Oncol*. 2015 Jul 28;8:92.
292. Tabernero J. et al. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectalcarcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2015 May;16(5):499-508.
293. Li J et al. Regorafenib plus best supportive care versus placebo plus best supportive care in Asian patients with previously treated metastatic colorectal cancer (CONCUR): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015 Jun;16(6):619-29.
294. Puthillath A, Patel A, Fakhri MG. Targeted therapies in the management of colorectal carcinoma: role of bevacizumab. *OncoTargets and therapy*. 2009; 2: 1-15.
295. Kopetz S. et al. Phase II study of infusional 5-fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) plus bevacizumab as first-line treatment for metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition)*. Vol 25, No 18S (June 20 Supplement), 2007: 4089
296. Sobrero A. et al. Efficacy and safety of bevacizumab in combination with irinotecan and infusional 5-FU as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition)*. Vol 24, No 18S (June 20 Supplement), 2006: 3544

297. Ackland S.P. et al. Updated efficacy data from AVIRI: A large phase IV trial of first-line bevacizumab plus FOLFIRI in patients with mCRC. Gastrointestinal Cancers Symposium 2008;Orlando; 2008. Abstract No:463
298. Sobrero A. et al. Phase IV study of bevacizumab in combination with infusional fluorouracil, leucovorin and irinotecan (FOLFIRI) in first-line metastatic colorectal cancer. *Oncology*. 2009;77(2):113-9.
299. Hochster H.S. et al. Safety and efficacy of oxaliplatin and fluoropyrimidine regimens with or without bevacizumab as first-line treatment of metastatic colorectal cancer: Results of the Study. *J Clin Oncol*. 2008;26(21):3523–9.
300. Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008; 26(12): 2013-9.
301. Kabbinavar F. et al. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21(1):60–5
302. Kabbinavar F.F. et al. Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005; 23(16): 3697-705.
303. Giantonio B.J. et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007; 25(12): 1539-44.
304. Bennouna J. 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.
305. Masi G. 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.
306. Stein A. et al. Upfront FOLFOXIRI+bevacizumab followed by fluoropyrimidin and bevacizumab maintenance in patients with molecularly unselected metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015 Sep 15;113(6):872-7.
307. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02246049>
308. Stein A. et al. Treatment with bevacizumab and FOLFOXIRI in patients with advanced colorectal cancer: presentation of two novel trials (CHARTA and PERIMAX) and review of the literature. *BMC Cancer*. 2012 Aug 16;12:356.

309. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02271464?term=moma&rank=4>
310. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02339116?term=TRIBE+2&rank=1>
311. Cunningham D. et al. Bevacizumab plus capecitabine versus capecitabine alone in elderly patients with previously untreated metastatic colorectal cancer (AVEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2013; 14(11): 1077-85.
312. Adams R.A. et al. Intermittent versus continuous oxaliplatin and fluoropyrimidine combination chemotherapy for first-line treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet Oncol* 12, 642-53 (2011).
313. Wasan H. et al. Intermittent chemotherapy plus either intermittent or continuous cetuximab for first-line treatment of patients with KRAS wild-type advanced colorectal cancer (COIN-B): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* 15, 631-9 (2014).
314. Heinemann V. 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. *Lancet Oncol* 15, 1065-75 (2014).
315. Stintzing, S. et al. Independent radiological evaluation of objective response, early tumor shrinkage, and depth of response in FIRE-3 (AIO KRK-0306) in the final RAS evaluable population. *Esmo* 2014 (2014).
316. Modest D.P. et al. Impact of Subsequent Therapies on Outcome of the FIRE-3/AIO KRK0306 Trial: First-Line Therapy With FOLFIRI Plus Cetuximab or Bevacizumab in Patients With KRAS Wild-Type Tumors in Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2015 Nov 10;33(32):3718-26.
317. Schwartzberg L.S. 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. *J Clin Oncol* 32, 2240-7 (2014).
318. Rivera, F. et al. First-line treatment with modified FOLFOX6 (mFOLFOX6) + panitumumab (pmab) or bevacizumab (bev) in wild-type (WT) RAS metastatic colorectal carcinoma (mCRC): Tumor response outcomes beyond RECIST. *J Clin Oncol* 33 (2015).
319. Douillard J.Y. et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. (2013) *N Engl J Med* 369:1023–1034.
320. Venook, A. et al. CALGB/SWOG 80405: Phase III trial of irinotecan/5-FU/leucovorin (FOLFIRI) or oxaliplatin/5-FU/leucovorin (mFOLFOX6) with bevacizumab (BV) or cetuximab (CET) for patients (pts) with KRAS wild-type (wt) untreated metastatic adenocarcinoma of the colon or rectum (MCR). *J Clin Oncol* 32:5s, (suppl; abstr LBA3) (2014).
321. Lenz, H. et al. CALGB/SWOG 80405: Phase III trial of irinotecan/5FU/leucovorin (FOLFIRI) or oxaliplatin/5FU/leucovorin (mFOLFOX6) with bevacizumab (BV) or cetuximab (CET) for patients (pts) with expanded RAS analyses

- untreated metastatic adenocarcinoma of the colon or rectum (mCRC). *Ann Oncol* 25, Suppl 5: v1–v41, 2014 (2014).
322. de Gramont A. et al. Reintroduction of oxaliplatin is associated with improved survival in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 25, 3224-9 (2007).
323. Chibaudel B. et al. Can chemotherapy be discontinued in unresectable metastatic colorectal cancer? The GERCOR OPTIMOX2 Study. *J Clin Oncol* 27, 5727-33 (2009).
324. Labianca R. et al. Intermittent versus continuous chemotherapy in advanced colorectal cancer: a randomised 'GISCAD' trial. *Ann Oncol* 22, 1236-42 (2011).
325. Garcia Alfonso P. et al. Phase II study of first-line mFOLFOX plus cetuximab (C) for 8 cycles followed by mFOLFOX plus C or single agent (s/a) C as maintenance therapy in patients (p) with metastatic colorectal cancer (mCRC): the MACRO-2 trial (Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumors [TTD]). *Ann Oncol* 25 (2014)
326. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02476045?term=VALENTINO&rank=1>
327. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02484833?term=ERMES&rank=1>
328. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01991873?term=PANAMA&rank=10>
329. Sastre J. et al. First-line cetuximab plus capecitabine in elderly patients with advanced colorectal cancer: clinical outcome and subgroup analysis according to KRAS status from a Spanish TTD Group Study. *Oncologist* 17, 339-45 (2012).
330. Garufi C. et al. Cetuximab plus chronomodulated irinotecan, 5-fluorouracil, leucovorin and oxaliplatin as neoadjuvant chemotherapy in colorectal liver metastases: POCHER trial. *Br J Cancer* 103, 1542-7 (2010).
331. Assenat E. et al. Cetuximab plus FOLFIRINOX (ERBIRINOX) as first-line treatment for unresectable metastatic colorectal cancer: a phase II trial. *Oncologist* 16, 1557-64 (2011).
332. Folprecht G. et al. 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* 14, 521 (2014).
333. Saridaki Z. et al. A triplet combination with irinotecan (CPT-11), oxaliplatin (LOHP), continuous infusion 5-fluorouracil and leucovorin (FOLFOXIRI) plus cetuximab as first-line treatment in KRAS wt, metastatic colorectal cancer: a pilot phase II trial. *Br J Cancer* 107, 1932-7 (2012).
334. Fornaro L. et al. FOLFOXIRI in combination with panitumumab as first-line treatment in quadruple wild-type (KRAS, NRAS, HRAS, BRAF) metastatic colorectal cancer patients: a phase II trial by the Gruppo Oncologico Nord Ovest (GONO). *Ann Oncol* 24, 2062-7 (2013).
335. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02295930?term=MACBETH&rank=1>
336. Cremolini C. et al. Modified FOLFOXIRI plus cetuximab (cet) as induction treatment in unresectable metastatic colorectal cancer (mCRC) patients (pts):

- Preliminary results of the phase II randomized Macbeth trial by GONO group. *J Clin Oncol* 32, suppl; abstr 3596 (2014).
337. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01328171?term=VOLFI&rank=1>
338. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01802645>
339. Aprile G. et al. Maintenance Therapy in Colorectal Cancer: Moving the Artillery Down While Keeping an Eye on the Enemy. *Clinical Colorectal Cancer*, Vol. 15, No. 1, 7-15 (2016)
340. Mancuso M.R. et al. Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J Clin Invest* 2006; 116:2610-21.
341. Powles T. et al. A prospective evaluation of VEGF-targeted treatment cessation in metastatic clear cell renal cancer. *Ann Oncol* 2013; 24: 2098-103.
342. Roberts D.L. et al. Contribution of HIF-1 and drug penetrance to oxaliplatin resistance in hypoxic colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 2009; 101:1290-7.
343. Han X.X. et al. Effects of bevacizumab on the neovascular membrane of proliferative diabetic retinopathy: reduction of endothelial cells and expressions of VEGF and HIF-1a. *Mol Vis* 2012; 18:1-9
344. Simkens L.H. et al. Maintenance treatment with capecitabine and bevacizumab in metastatic colorectal cancer (CAIRO3): a phase 3 randomised controlled trial of the Dutch Colorectal Cancer Group. *Lancet* 2015; 385:1843-52.
345. Hegewisch-Becker S. et al. Maintenance strategies after first-line oxaliplatin plus fluoropyrimidine plus bevacizumab for patients with metastatic colorectal cancer (AIO 0207): a randomised, non-inferiority, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015. pii: S1470-2045(15)00042-X.
346. Koeberle D. et al. Bevacizumab continuation versus no continuation after first-line chemo-bevacizumab therapy in patients with metastatic colorectal cancer: a randomized phase III non inferiority trial (SAKK 41/06). *J Clin Oncol* 2013;(suppl), abstract 3503.
347. Pereira A.A.L. et al. The effect of chemotherapy delivered until progression versus complete stop on the overall survival of patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized trials. *J Clin Oncol* 2014; 32(suppl 5):3542.
348. Pfeiffer P. et al. Maintenance Therapy With Cetuximab Every Second Week in the First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: The NORDIC-7.5 Study by the Nordic Colorectal Cancer Biomodulation Group. *Clin Colorectal Cancer*. 2015 Sep;14(3):170-6.
349. Vilorio-Petit A. et al. Acquired Resistance to the Antitumor Effect of Epidermal Growth Factor Receptor-Blocking Antibodies in Vivo: A Role for Altered Tumor Angiogenesis. *Cancer Res* 61: 5090-5101 (2001)
350. Ciardiello F. et al. Antitumor Activity of Zd6474, a Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Human Cancer Cells with Acquired

- Resistance to Antiepidermal Growth Factor Receptor Therapy. *Clin Cancer Res* 10: 784-793. (2004)
351. Benavente S. et al. Establishment and Characterization of a Model of Acquired Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Targeting Agents in Human Cancer Cells. *Clin Cancer Res* 15: 1585-1592. (2009)
352. Bianco R. et al. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Contributes to Resistance to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Drugs in Human Cancer Cells. *Clin Cancer Res* 14: 5069-5080. (2008)
353. Bendell J.C. et al. STEAM: A randomized, open-label, phase 2 trial of sequential and concurrent FOLFOXIRI-bevacizumab (BEV) versus FOLFOX-BEV for the first-line (1L) treatment (tx) of patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol* 32:5s, 2014 (suppl; abstr TPS3652).