



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

**Ruolo prognostico delle mutazioni di p53 in
pazienti con tumore del colon-retto
metastatico in trattamento con TAS-102**

Relatore: Chiar.ma
Prof.ssa Rossana Berardi

Tesi di Laurea di:
Silvia Stramucci

Correlatore: Chiar.mo
Prof. Riccardo Giampieri

A.A. 2019/2020

Sommario

ABSTRACT	2
Capitolo 1	4
INTRODUZIONE.....	4
1.1 <i>Carcinoma del colon-retto: epidemiologia (1,2,3).....</i>	4
1.1.1 <i>Incidenza</i>	4
1.1.2 <i>Mortalità</i>	5
1.1.3 <i>Prevalenza.....</i>	6
1.1.4 <i>Sopravvivenza.....</i>	6
1.2 <i>Fattori di rischio</i>	7
1.2.1 <i>Fattori ambientali:.....</i>	7
1.2.2 <i>Fattori genetici:</i>	9
1.2.3 <i>Malattie croniche infiammatorie intestinali:</i>	11
1.2.4 <i>Età:.....</i>	11
1.2.5 <i>Presenza di polipi adenomatosi:.....</i>	11
1.3 <i>Progressione del CRC e alterazioni molecolari</i>	14
1.4 <i>Clinica</i>	21
1.5 <i>Screening</i>	22
1.6 <i>Diagnosi</i>	24
1.7 <i>Inquadramento diagnostico</i>	25
1.7.1 <i>Classificazione</i>	25
1.7.2 <i>Stadiazione</i>	26
1.7.3 <i>Anatomia patologica.....</i>	27
1.8 <i>Fattori prognostici e predittivi:</i>	28
1. 9 <i>Trattamento:</i>	30
1.9.1 <i>Malattia non metastatica:</i>	30
1.9.2 <i>Malattia metastatica:</i>	33
1.9.3 <i>Nuove prospettive di terapia: Immunoterapia</i>	41
1.10 <i>LONSURF (TAS-102)</i>	42
Capitolo 2	48
Introduzione, Pazienti e Metodi.....	48
2.1 <i>Introduzione e scopo dello studio.....</i>	48
2.2 <i>Pazienti e metodi.</i>	49
2.2.1 <i>Pazienti</i>	49
2.2.2 <i>Metodi: analisi statistica.....</i>	50

2.3 Metodi: analisi anatomo-patologica	50
Risultati	51
3.1 Caratteristiche della coorte in studio:	51
3.2 Analisi statistica	53
Capitolo 4	58
Discussione	58
Bibliografia.....	63

ABSTRACT

Background: Il TAS-102 è stato recentemente introdotto tra le opzioni di trattamento nel carcinoma del colon-retto metastatico pretrattato. Grazie al buon profilo di sicurezza il numero dei pazienti trattati sta progressivamente incrementando. Contestualmente ai risultati raggiunti nei trial clinici circa il 40% dei pazienti sottoposti al farmaco raggiunge il controllo della patologia (malattia stabile o risposta parziale) alla prima valutazione radiologica. Nei precedenti modelli preclinici è stato dimostrato che la mutazione di p53 può influire sulla sensibilità delle cellule al trattamento. Abbiamo condotto un'analisi retrospettiva riguardante i pazienti con carcinoma del colon-retto metastatico trattati con TAS-102 per valutare come lo stato di p53 wild type sia associato ad un outcome favorevole.

Metodi: la ricerca dello stato mutazionale di p53 è stata eseguita grazie alla tecnica dell'immunoistochimica. Due differenti anatomo-patologi hanno eseguito l'analisi in doppio cieco sui campioni più recenti a disposizione. Il cut-off per definire la presenza o meno della mutazione p53 è stato fissato al 20%. Abbiamo raccolto retrospettivamente i dati inerenti ai pazienti che hanno risposto al trattamento (tramite RECIST criteria 1.1) durante la somministrazione di TAS-102 e definito il controllo di malattia (DCR) come la somma dei pazienti che avevano raggiunto la risposta parziale, completa o malattia stabile al primo esame radiologico. Abbiamo inoltre calcolato gli outcome di sopravvivenza (progressione libera da malattia, PFS e sopravvivenza complessiva, OS) mediante il metodo di Kaplan Meier. Per stratificare i pazienti si sono utilizzati i seguenti fattori: sesso, età, precedente utilizzo di regorafenib, performance status (PS) e la presenza di mutazioni di K-ras\N-ras\B-raf. L'associazione con le variabili è stata valutata mediante il test di Fisher per le variabili binomiali (o mediante Chisquare test per le altre istanze). Il long-rank test è stato utilizzato per valutare le differenze considerando un livello di significatività statistica p fissato per tutte le analisi a 0.05.

Risultati: sono stati reclutati 37 pazienti, il DCR dell'intero gruppo era del 37% con PFS mediana di 3.87 mesi e OS mediana di 10.95 mesi. Al momento dell'analisi 32/37 (86%) dei pazienti avevano già sviluppato una progressione e 19/37 (51%) erano già morti. 20/37 (54%) presentavano p53 mutato mentre 17/37 (46%) presentavano p53 wild type. Il DCR nei soggetti p53 wild type a confronto dei soggetti con p53 mutato era rispettivamente pari a 62% vs 16% (p=0.00063). PFS mediana con p53 wild type e mutato era rispettivamente pari a 6.98 vs 3.44 mesi (HR per progressione 0.48, 95%CI: 0.23-0.97, p= 0.035). L'OS

mediana per p53 wild type vs mutato è risultata, rispettivamente, pari a 14.65 vs 10.75 mesi (HR per morte 0.80, 95%CI: 0.31-2.03, $p=0.065$). Le altre variabili di stratificazione non sono risultate associate con una differente DCR, PFS o OS, con l'eccezione della performance status. In particolare, il PS è risultato correlato al DCR ($p=0.034$) e alla OS ($p<0.0001$). L'analisi multivariata ha confermato un ruolo prognostico indipendente di p53 ($p=0.021$) e di ECOG PS ($p=0.024$).

Conclusioni: lo stato di p53 wild type può essere associato con una prognosi migliore per i pazienti in terapia con TAS-102 per carcinoma del colon retto metastatico precedentemente trattato. Lo stato mutazionale di p53 dovrebbe essere indagato più di frequente in particolar modo per il ruolo predittivo piuttosto che prognostico che può rivestire e dovrebbe essere eseguito al fine di poter scegliere tra le varie opzioni a disposizione per il carcinoma del colon retto metastatico.

Capitolo 1

INTRODUZIONE

1.1 Carcinoma del colon-retto: epidemiologia (1,2,3)

1.1.1 Incidenza

Il carcinoma coloretale rappresenta il 10,2% dei nuovi casi di tumore a livello mondiale con lievi variazioni in relazione al sesso ed incidenza che varia dal 10,9 % nei soggetti di sesso maschile contro i 9,5% nei soggetti di sesso femminile. L'elevata incidenza del carcinoma si attesta terza a seguito del carcinoma del polmone e della mammella (1-2).

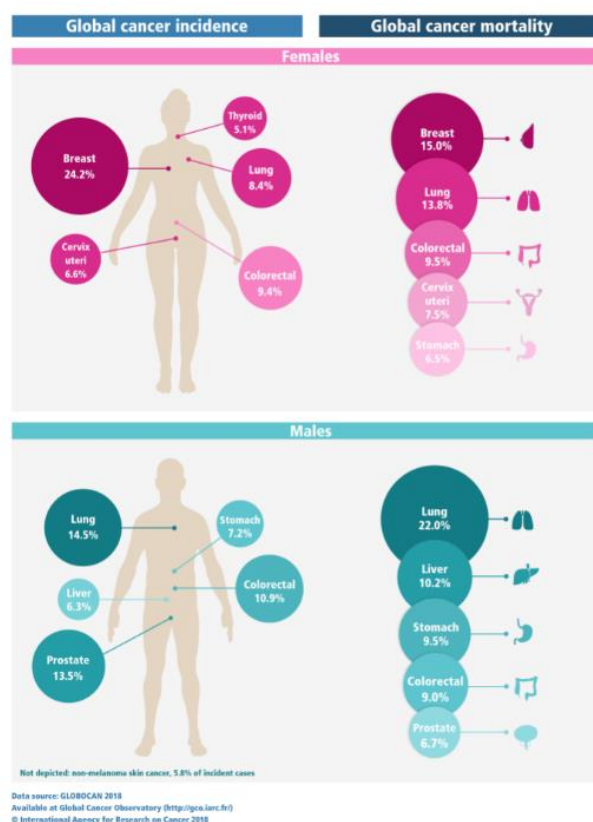


Figura 1: incidenza e mortalità neoplastica a confronto nel sesso maschile e femminile. Globocan 2018

A livello europeo è seconda per incidenza nei soggetti di sesso femminile (12.3%) dopo il carcinoma della mammella, mentre nei soggetti di sesso maschile è terza per incidenza (13.2%) dopo prostata e polmone.

A livello nazionale sono attese 49000 nuove diagnosi nel 2019 (27000 uomini e 22000 donne), la possibilità di sviluppare un tumore colo-rettale nell'arco della propria vita è a pari a 1/13 negli uomini e 1/21 nelle donne. In Italia si osserva una spiccata disomogeneità a riflettere l'andamento degli screening con incidenza maggiore al centro rispetto al sud.

1.1.2 Mortalità

Il carcinoma del colon rappresenta la seconda neoplasia per mortalità al mondo dopo il carcinoma del polmone con una percentuale pari al 9.2%, si osservano leggere fluttuazioni in relazione al genere maschile o femminile rispettivamente con percentuale del 9% e 9,5%. Considerando le differenti fasce di età la mortalità è pari al 6.1% nella fascia tra i 25 e 55 anni e 9% tra i 55 e gli 80 anni.

A livello nazionale nel 2016 i decessi per il tumore del colon-retto sono stati quasi 20.000 (11.000 uomini e 9.000 donne). Il carcinoma del colon-retto è la seconda causa di morte sia negli uomini (11%) che nelle donne (12%). La possibilità di morire per questo tumore è pari a 1/28 negli uomini e 1/50 nelle donne.

Rango	Maschi	Femmine	Tutta la popolazione
1°	Polmone (27%)	Mammella (17%)	Polmone (12%)
2°	Colon-retto (11%)	Colon-retto (12%)	Colon-retto (7%)
3°	Prostata (8%)	Polmone (11%)	Mammella (4%)
4°	Fegato (7%)	Pancreas (8%)	Pancreas (4%)
5°	Stomaco (6%)	Stomaco (6%)	Fegato (4%)

Figura 2. Prime cinque cause di morte oncologica a proporzione sul totale dei decessi oncologici per sesso. Pool AIRTUM 2010-2015

1.1.3 Prevalenza

A livello mondiale la prevalenza in un periodo di 5 anni è pari al 10.9% con fluttuazioni in relazione al sesso, soggetti di sesso femminile 9.6% e maschile 12.3%.

In Italia sono circa 481.000 le persone con pregressa diagnosi di tumore coloretale (16% uomini e 12% donne). In considerazione alla stabile lieve tendenza al decremento della mortalità osservata da ormai lungo periodo, sono soprattutto l'incidenza (con la sempre maggiore tendenza alla diagnosi precoce e alla diffusione dei programmi di screening di questi ultimi anni) e la sostanziale buona sopravvivenza (tendente al miglioramento) a condizionare i "numeri" delle persone che convivono con questo tipo di diagnosi e la loro distribuzione lungo la storia clinica, con evidenti diverse esigenze assistenziali e di sostegno nel follow-up. Oltre 51.000 sono le persone che hanno sviluppato un tumore del colon-retto in Italia da più di 20 anni e oltre 117.000 tra i 10 e i 20 anni che possono considerarsi ormai guarite.

1.1.4 Sopravvivenza

Il carcinoma del colon-retto presenta complessivamente una prognosi favorevole rispetto a molti altri tumori solidi. La sopravvivenza a 5 anni dei tumori del colon-retto è pari a 65%, senza differenze tra maschi e femmine. Presenta valori elevati tra i pazienti giovani, passando dal 69% tra 15 e 44 anni al 54% tra gli anziani (75+).

Le Regioni meridionali presentano indici di sopravvivenza inferiori di circa il 6-8% rispetto al Centro-Nord nei maschi e del 5-6% nelle femmine. La sopravvivenza a 10 anni dalla diagnosi risulta leggermente inferiore rispetto quella a 5 anni, con valori pari al 64% per il colon e al 58% per il retto, omogenea tra uomini e donne.

1.2 Fattori di rischio

Il carcinoma coloretale è una patologia eterogenea nella quale insorgenza intervengono numerosi fattori genetici, epigenetici ed ambientali.

1.2.1 Fattori ambientali:

La notevole variabilità di incidenza che si è andata a riscontrare nelle diverse aree geografiche, le etnie, gli studi migrazionali lasciano presupporre che andando ad agire su una base di predisposizione genetica nel determinismo del cancro del colon-retto entrino in gioco numerosi altri fattori, definiti ambientali, con ruolo importante nel processo della cancerogenesi. I fattori sembrano inoltre andare ad agire su diverse tempistiche dello sviluppo del cancro in relazione al fatto che mentre l'uso di alcuni farmaci e il fumo di sigaretta favoriscono l'insorgenza di formazioni adenomatose, l'obesità e la ridotta attività fisica sembrano esercitare il proprio ruolo nelle fasi tardive quindi nella progressione neoplastica (4). Preposizioni vere per il tumore sporadico in quanto nelle forme familiari e genetiche ruolo preponderante è determinato dalle mutazioni genetiche tuttavia i fattori ambientali si sono dimostrati fondamentali per lo sviluppo del carcinoma del colon-retto anche in questi soggetti (5). È stato dimostrato che l'aderenza ad uno stile di vita sano è correlato ad un rischio assoluto minore di sviluppo in qualsiasi categoria di soggetti con rischio genetico (6).

I principali fattori ambientali sono:

- **Dieta:** vi è evidenza che la dieta ricca di grassi saturi favorisca la sua comparsa così come l'alta ingestione calorica; si sono dimostrate dannose in particolar modo l'assunzione di carni rosse, insaccati, farine e zuccheri raffinati. Per quanto riguarda il consumo di carne l'argomento è complesso in quanto un consumo eccessivo di carni lavorate (salumi, insaccati e carne in scatola) aumenta il rischio di sviluppare alcuni tumori in maniera proporzionale alla quantità e frequenza dei consumi per cui un apporto pari a 1-2 volte alla settimana sembra essere accettabile anche per l'apporto di nutrienti preziosi (7). Importante considerare la cottura della carne in quanto la fiamma e la bruciatura liberano sostanze cancerogene (amine) e

aumentano l'indice glicemico determinando l'attivazione del pathways dell'insulina (8).

I supplementi di calcio e acido acetilsalicilico così come il consumo di frutta, verdure e carboidrati non raffinati sembrano avere un effetto protettivo. Il calcio è considerato un agente protettivo in quanto attraverso un legame con gli acidi biliari e gli acidi grassi nel lume del colon riduce l'incidenza degli adenomi, l'assunzione conduce ad una riduzione del rischio del cancro del colon distale grazie ad una riduzione dell'attività proliferativa delle cellule della mucosa colica (9). La fibra, invece, non ha dimostrato alcun beneficio (10).

- Attività fisica: considerato un fattore di rischio indipendente, la scarsa attività si correla con un'associazione statisticamente significativa con il tumore del colon (soprattutto del tratto prossimale), riduzione è stata invece osservata in presenza di regolare attività sportiva (11).
- Fumo: è stato riconsiderato come fattore di rischio abbastanza importante in quanto sembra andare a ridurre l'efficacia del trattamento chemioterapico, è stato inoltre osservato che gli estratti del fumo di sigaretta possono determinare una deregolazione del ciclo cellulare mediante l'alterata espressione delle cellule regolatrici del ciclo cellulare e delle proteine pro-apoptotiche. Stimolano quindi l'attività metastatica grazie all'alterazione della transizione epitelio-mesenchimale e l'espressione della catepsina D. (12)
- Obesità: un elevato indice di massa corporea ($BMI > 29$) e la maggiore adiposità centrale, tipica del sesso maschile, sembrano rappresentare un fattore di rischio non solo per lo sviluppo di adenomi ma anche l'incentivo alla progressione neoplastica. L'obesità così come l'inattività fisica e il diabete di tipo II assumono ruolo centrale nella genesi del cancro secondariamente alla condizione di iperinsulinemia e, quindi, di elevati valori di IGF-1. Ambedue sono coinvolti nella progressione e nella metastatizzazione, attraverso l'induzione della crescita delle cellule e l'inibizione dell'apoptosi (13).

- Alcool: presumibilmente secondario all'azione dell'acetaldeide, composto derivante dalla detossificazione dell'alcool che antagonizza il metabolismo del folato e della metionina (14).

1.2.2 *Fattori genetici:*

La cancerogenesi è un processo di carattere multifasico dove l'insorgenza di multiple alterazioni genetiche andranno a determinare la trasformazione della mucosa colica normale in adenocarcinoma, tale trasformazione richiede un lungo periodo di tempo (15-20 anni) ed è caratterizzata da parallele modificazioni sul versante molecolare e istologico. I geni più frequentemente interessati sono gli oncogeni nei quali è sufficiente una mutazione con guadagno di funzione in un solo allele (eterozigosi) o, più frequentemente, una mutazione interessante gli oncosoppressori. Quest'ultimi inibiscono la proliferazione cellulare e possono attivare i meccanismi dell'apoptosi e includono i geni di riparo del DNA i quali controllano la fedeltà della replicazione del DNA e la sua integrità. Per questi geni è necessario che ambedue gli alleli siano mutati con perdita di funzione (omozigosi). Nella maggior parte dei casi le mutazioni genetiche presenti nel genoma della cellula tumorale sono somatiche e non verranno quindi tramandate, in questo caso si parla di cancro sporadico. In circa il (6%) dei pazienti invece le alterazioni sono genetiche quindi presenti a livello della linea germinale (15).

Tra le sindromi genetiche che possono interessare il colon-retto rivestono particolare rilievo:

- HNPCC o sindrome di Lynch (5-7%): Forma più frequente del carcinoma del colon ereditario è associato ai geni responsabili della riparazione dei disallineamenti del DNA meglio conosciuti come geni del mismatch repair quali MSH2, MSH6, MLH1 e PMS2. Predisporre prevalentemente al CRC mediamente in età più giovane rispetto alla popolazione generale, al cancro dell'endometrio e, con rischio più basso, a diversi ulteriori tumori con interessamento di ovaio, pelvi renale-uretere, pancreas-vie biliari e stomaco. Carcinomi colorettali MSI high sono più frequentemente diagnosticati nel colon di destra e in giovane età, oltre che in uno stadio più precoce rispetto alle forme

stabili, mentre da un punto di vista istologico-molecolare prevalgono l'istotipo mucinoso e la scarsa differenziazione, oltre alla mutazione del gene BRAF (16).

- Poliposi adenomatosa del colon: responsabile dell'1% dei tumori del colon-retto la patologia si contraddistingue per la presenza di centinaia di migliaia di polipi adenomatosi pre-cancerosi solitamente di dimensioni inferiori al centimetro sessili o peduncolati e riscontrati anche a livello dello stomaco e del duodeno. Il difetto genetico è ereditato con trasmissione autosomica dominante con una penetranza che si attesta intorno al 100% sembra essere dovuto a mutazioni puntiformi o a microdelezioni del gene APC situato sul braccio lungo del cromosoma 5, un allele mutato del gene è ereditato dal paziente e gli adenomi si sviluppano laddove il secondo allele sviluppa una mutazione o si perde. Si tratta di un disturbo complesso in quanto i pazienti nascono con una mutazione germinale del gene APC presente in ogni cellula di conseguenza possono comparire polipi o tumori anche in altre sedi del tratto digerente e manifestazioni extracoliche (17). Lo screening inizia alla pubertà con una sigmoidoscopia semestrale o annuale, questi pazienti vengono generalmente sottoposti ad una colectomia totale profilattica all'età di circa 20 anni se già documentata la presenza della mutazione specifica o in età adulta nel caso in cui la diagnosi sia più tardiva (18).
- Poliposi adenomatosa familiare attenuata: forma caratterizzata da un minor numero di polipi a sviluppo più tardivo che più comunemente è localizzata a livello del colon destro ed evolve a tumore maligno in età più avanzata rispetto alla FAP. Caratterizzata da un numero di adenomi pari all'incirca a 10-100 a differenza della FAP laddove è possibile evidenziare dai 100 ai 1000 polipi.

1.2.3 Malattie croniche infiammatorie intestinali:

L'associazione con le malattie croniche intestinali presenta particolare rilievo per la rettocolite ulcerosa dove il massimo rischio è osservato a 10 anni dalla comparsa della patologia a dispetto del morbo di Crohn. I fattori di rischio includono la durata prolungata della malattia, la presenza di una lunga storia di patologia infiammatoria, l'associazione con la colangite sclerosante e una storia di cancro del colon retto in famiglia. Alte dosi di aminosalicilati sono utilizzate per i loro effetti anti-infiammatori considerati buoni candidati per la prevenzione del rischio di CCR, analogamente presentano un effetto ritardante sull'evoluzione della displasia in carcinoma (19).

1.2.4 Età:

L'incidenza aumenta con l'età solitamente l'insorgenza si osserva dopo i 20 anni escludendo le forme con predisposizione genetica ma il picco di incidenza è dopo i 70 anni per questo motivo i programmi di screening iniziano dopo i 50 anni di età.

1.2.5 Presenza di polipi adenomatosi:

Gli adenomi sono vere e proprie lesioni pre-neoplastiche, anche se solo una piccola percentuale evolve in forme neoplastiche tuttavia la loro presenza deve porre un sospetto considerando che più del 95% dei tumori maligni del colon retto si presenta morfologicamente come un polipo.

La loro distribuzione nel grosso intestino è sovrapponibile con quella del tumore assunto vero in particolar modo in presenza di adenomi ad "alto rischio" laddove sussista una dimensione maggiore al centimetro, displasia di alto grado o adenomi villosi o tubulo-villosi (20).

L'esame endoscopico è l'unico che permette una migliore caratterizzazione in quanto rende possibile la biopsia.

Da un punto di vista istologico gli adenomi sono lesioni clonali che mostrano almeno una displasia di basso grado caratterizzata da nuclei ingranditi, ipercromatici ed allungati disposti in una configurazione stratificata lungo la membrana basale; mentre, la displasia di alto grado vanta un aumento del rapporto nucleo/citoplasma, una perdita più significativa di polarità, nuclei

che appaiono più "aperti" con nucleoli sempre più prominenti e mitosi atipiche. Il carcinoma in situ corrisponde alla displasia di alto grado a livello del quale le cellule del carcinoma si trovano limitate alla membrana basale senza superare la muscolaris mucosae quindi senza capacità di diffondere.

I fattori che influenzano il potenziale maligno sono: dimensioni (vi è proporzione diretta, i polipi con dimensione superiore al cm presentano il 50% di rischio di trasformazione maligna), istologia (rischio maggiore dell'istotipo villosa), grado di displasia, presenza di anomalie citogenetiche e molteplicità.

Possono essere convenzionalmente classificati, in base all'istotipo ed al grado di displasia secondo la classificazione istologica WHO (*World Health Organization Classification of Tumours*), in:

- Adenoma tubulare (componente tubulare > 80%) l'architettura è caratterizzata da lobuli circoscritti di strutture tubulari ben differenziate consiste in un epitelio superficiale che mostra displasia di basso grado che si estende verso il basso nella base, questi possono mostrare aree focali di displasia di alto grado con complessità architettonica, non ha un potenziale metastatico.
- Adenoma villosa presenta un'architettura villosa predominante (maggiore del 75%) e ha una maggiore propensione alla trasformazione maligna.
- Adenoma tubulo-villosa mostra una combinazione di architettura tubulare e villosa (componente villosa maggiore del 25%). La componente villosa degli adenomi si riferisce a proiezioni epiteliali simili a dita distanti dalle mucose muscolari (21).

La displasia viene distinta in basso grado (lieve o moderata) ed alto grado (grave), in base all'entità delle alterazioni architettrali (conformazione delle ghiandole e dei villi) e citologiche (muco secrezione, stratificazione, polarità, ipercromasia e polimorfismo nucleari, attività mitotica) (22).

Parallelamente agli adenomi, le altre lesioni precursori sono i polipi serrati o adenomi serrati. Il polipo serrato è un termine generico per indicare un

qualsiasi polipo che mostri un'architettura serrata (dentellata o stellata) del compartimento epiteliale delle cripte ghiandolari. Si tratta di un gruppo eterogeneo di lesioni che comprendono principalmente polipo iperplastico, adenoma/polipo sessile serrato ed adenoma serrato tradizionale.

La differenza, oltre che essere di tipo morfologico, riguarda anche la localizzazione di tali adenomi; i polipi iperplastici sono le lesioni serrate che si possono trovare più frequentemente nel colon distale, generalmente di piccole dimensioni (<5 mm) con semplice architettura tubolare con cripte allungate e regolari, mentre, l'adenoma serrato sessile (SSA) o polipo serrato sessile (SSP) si riferiscono alla stessa lesione dentata e sono attualmente utilizzati in modo intercambiabile. SSAs/SSPs sono più comunemente riscontrabili nel colon prossimale e di solito presentano dimensioni maggiori degli HPs. Nonostante il nome, gli SSAs/SSPs non presentano alterazioni displastiche dei nuclei, che caratterizzano invece gli adenomi convenzionali (23).

1.3 Progressione del CRC e alterazioni molecolari

Il carcinoma del colon esordisce secondariamente ad un processo di carattere multifattoriale laddove giocano un ruolo centrale le alterazioni molecolari a carico di numerosi oncogeni e oncosoppressori che cooperano nel determinare la trasformazione neoplastica. L'80% delle forme neoplastiche riconosce un'eziologia sporadica mentre il restante 20% include condizioni familiari o sindromi genetiche laddove assumono una posizione di rilievo la poliposi adenomatosa familiare ed il carcinoma del colon-retto ereditario non poliposico secondario a mutazioni dei geni del mismatch repair (24).

Nel processo di cancerogenesi del colon vengono riconosciuti tre principali pathways di trasformazione neoplastica:

- L'instabilità cromosomica CIN classe che comprende la maggioranza dei CRC sporadici, numerosi geni coinvolti nella carcinogenesi intestinale subiscono alterazioni genetiche dovute all'instabilità cromosomica come APC, TP53, KRAS, PTEN, SMAD 2 e 4 e TGF- β .
- L'instabilità microsatellitare si riscontra nel 15% dei casi sporadici di cancro al colon ma rappresenta la principale alterazione genetica nella sindrome di Lynch.
- La metilazione aberrante del DNA laddove la metilazione delle sequenze promotrici altera la capacità dei fattori di trascrizione di legarsi ad esse e promuovere la trascrizione. L'ipermetilazione anomala delle sequenze nucleotidiche dei promotori è frequente nel DNA dei pazienti affetti da CRC.

Alterazioni nel gene della poliposi adenomatosa cronica (APC) e adenoma precoce.

L'identificazione della mutazione nel gene APC ha permesso un grosso passo in avanti nella comprensione della patogenesi molecolare alla base del CRC sia nella malattia ereditaria (FAP) che sporadica (25).

Molteplici studi nel campo della biologia del cancro hanno dimostrato che l'80-90% dei tumori del CRC hanno inizio in seguito alla perdita di attività del gene APC (26).

Tale gene codifica per una proteina presente in una varietà di tessuti epiteliali, gli studi indicano che APC partecipa a varie funzioni cellulari tra cui proliferazione, differenziazione, apoptosi, adesione, migrazione e segregazione cromosomica tramite i domini funzionali di cui è costituita (27).

Un ruolo essenziale svolto da APC sta nella regolazione negativa della β -catenina che può tradursi in due diverse conseguenze per la crescita cellulare: 1) supportare l'espressione di c-Myc e di altre proteine che promuovono la divisione cellulare; 2) svolgere un ruolo nei processi di adesione cellulare, aumentando efficacemente la viscosità delle cellule epiteliali superficiali. In entrambi i casi la repressione della β -catenina determina la tendenza ad un'espansione anomala dei tessuti, questo perché l'aumento della espressione di APC con conseguente repressione della β -catenina induce apoptosi nelle cellule che si avvicinano alla superficie della cripta in modo da bilanciare la produzione delle cellule alla base della cripta con la diminuzione delle stesse sulla superficie evitando la formazione di protuberanze tissutali anomale.

Nel CRC la perdita di APC è conseguente a due mutazioni inattivanti o la combinazione di una mutazione con un evento di perdita di eterozigosi da ricombinazione somatica o perdita cromosomica e conseguente alterazione dei domini di soppressione della β -catenina.

Le mutazioni in APC si riscontrano anche nei piccoli tumori benigni mentre mutazioni in geni come p53 e KRAS si osservano solamente negli stadi avanzati della tumorigenesi ad indicare che l'anomalia genetica in APC porta ad una progressione nell'accumulo di mutazioni in geni regolatori e, a livello morfologico, alla perdita dell'inibizione da contatto con conseguente formazione della massa aberrante posizionata sulla superficie delle cripte.

Alterazioni nei proto-oncogeni RAS e RAF e adenoma intermedio

La mutazione del gene RAS si verifica spesso negli eventi genetici di progressione del tumore verso l'adenoma intermedio poiché questo gene codifica per una proteina G monomerica appartenente alla famiglia delle GTPasi con capacità di legare ed idrolizzare la guanosina trifosfato (GTP) implicata nella regolazione del ciclo cellulare, proliferazione e differenziamento. Un'anomalia in queste vie di segnalazione porta all'insorgenza di neoplasie, questo dato è supportato dal fatto che circa il 70% dei tumori mostra vari livelli di mutazione di RAS. L'attivazione di RAS si ha nelle membrane dove passa da stato attivo, tramite scambio di nucleotidi guaninici (GEF) a stato inattivo, tramite proteina attivante la GTPasi (GAP) (28).

GEF e GAP sono in grado di svolgere una varietà di interazioni con altre proteine, lipidi e molecole regolatrici che controllano i livelli di RAS attivi e inattivi a livello della membrana cellulare dove vengono traslocati in prossimità di RAS (29).

Conseguentemente all'attivazione di RAS vengono reclutati sulla membrana plasmatica gli effettori, come RAF, in modo da attivare la cascata di segnalazione e svolgere i processi regolativi dipendenti dal pathway di RAS (30).

Nelle cellule i proto-oncogeni RAS corrispondono a tre tipi H-RAS, K-RAS, N-RAS e sono espressi in tutti i tessuti con frequenza diversa (31).

Le mutazioni che svolgono un ruolo nella tumorigenesi del CRC vedono coinvolta più frequentemente la proteina KRAS e solo in pochi casi HRAS e NRAS.

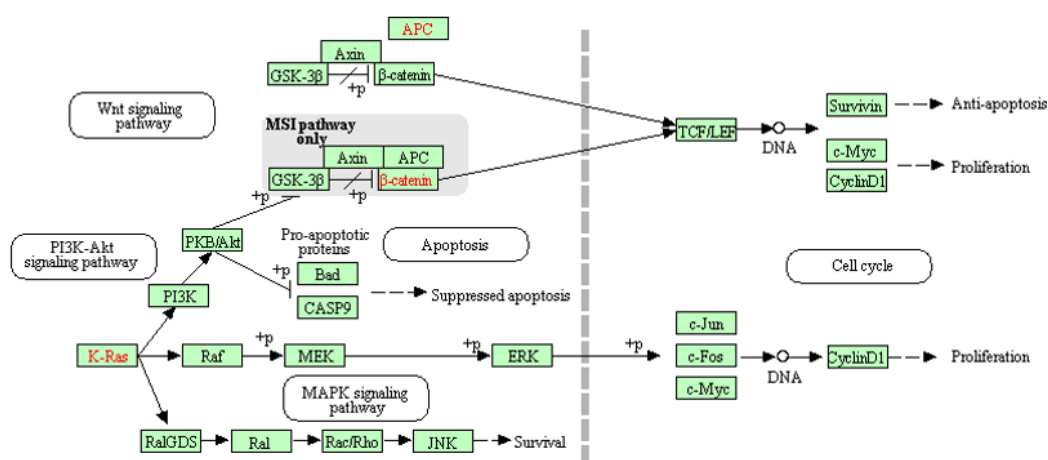


Figura 3. Le vie di trasduzione del segnale di KRAS nel carcinoma del colon-retto. Kegg Homo Sapiens (Human).

KRAS possiede tre effettori a valle; PI3K, RAF, RAL-GDS, che aumentano la loro attività dopo l'associazione con RAS.

Il pathway di RAS maggiormente conosciuto fa riferimento all'attivazione della chinasi RAF (Ser/Thr kinase) tramite la sua porzione N-terminale situata nel citoplasma. Questa attivazione avviene nella membrana citoplasmatica ed induce un cambiamento conformazionale in RAF liberando uno o più residui di fosforilazione e stabilizzandola. Il legame RAS/RAF è transitorio ed una volta avvenuto RAF diventa indipendente da RAS, si distacca dalla membrana ed attiva una cascata fosforilativa di chinasi citoplasmatiche e nucleari determinando l'attivazione di fattori trascrizionali, come i membri della famiglia Ets. Questi fattori regolano l'espressione di geni specifici che codificano per proteine coinvolte nel controllo della proliferazione e differenziamento cellulare. La stessa cascata di chinasi stimolata dal complesso RAS / RAF induce la proliferazione cellulare e l'espressione

di almeno due inibitori delle chinasi ciclina dipendenti (CDK inhibitors), p21^{WAF1} e p16^{INKa}. (32)

Cellule quiescenti in fase G₀ entrano in fase G₁ tramite picco di attivazione RAS associato alla cascata di segnalazione di RAF/MEK/ERK risultante nella regolazione positiva della ciclina D1 e p21^{CIP1} e nella regolazione negativa di p27^{Kip1} (33).

Questa cascata di segnalazione (RAS/RAF/MEK/ERK) (34) è nota anche come via MAPK e riceve input da più fonti tra cui stress metabolico interno, vie di danno al DNA, concentrazioni di proteine alterate, nonché attraverso la segnalazione proveniente da fattori di crescita esterni leganti il recettore EGFR (recettore del fattore di crescita dell'epidermide), interazioni cellula-matrice e comunicazione cellula-cellula (35).

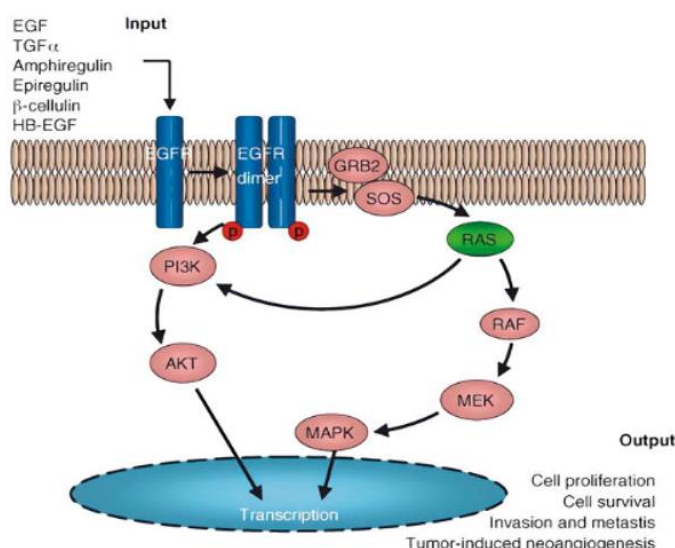


Figura 4. Pathways MAPK. (Prince 2019)

Nel CRC le mutazioni possono coinvolgere anche la chinasi RAF costituita da tre domini conservati. Nella famiglia di protein chinasi RAF, il gene BRAF è il più frequentemente mutato e rimane l'attivatore più potente di MEK. La più comune è la mutazione V600E (MT), questa mutazione ottiene come risultato una proteina BRAF costitutivamente

attiva aumentando di 10 volte il normale funzionamento della chinasi wild-type.

Le mutazioni in KRAS e BRAF non offrono alcun vantaggio selettivo nello sviluppo di tumori trovandosi sul medesimo pathway, per questo motivo sono mutualmente esclusive.

Dunque, non ci sono controversie nell'affermare che le vie di segnalazione dipendenti da KRAS giocano un ruolo preponderante nel mantenimento del normale status cellulare e che mutazioni coinvolgenti il recettore EGFR a monte di KRAS, o che colpiscono la stessa chinasi o chinasi a valle come BRAF, inducono anomalie nella regolazione del ciclo cellulare che possono sfociare nella carcinogenesi.

A tal proposito queste oncoproteine possono essere considerate un bersaglio appropriato per la progettazione di farmaci da utilizzare nella terapia a bersaglio mirato (36).

Alterazioni dell'oncosoppressore p53 e adenocarcinoma

La cancerogenesi può risultare associata a mutazioni del gene TP53 che determinano una perdita di funzionalità (loss-of-function, LOF) oppure acquisto di nuove funzioni (gain-of-function, GOF) della proteina codificata che lo rende un proto-oncogene a tutti gli effetti. P53 è un fattore di trascrizione inducibile dallo stress o danno al DNA che regola a valle un gran numero di geni diversi tramite i quali esercita le sue funzioni di soppressione del ciclo cellulare, induzione di senescenza e di apoptosi (39).

Il gene umano TP53 è collocato sul braccio corto del cromosoma 17 nella regione 17p13 e costituito da 11 esoni e 10 introni. La perdita di funzionalità dovuta a mutazione su entrambi gli alleli si verifica nel 10% degli adenomi precoci ed intermedi, nel 30% degli adenomi tardivi e nel 75% dei tumori avanzati (40).

Circa l'80% dei CRC presentano gravi aberrazioni cromosomiche in cui viene a mancare una regione cromosomica oppure un intero cromosoma. Un cromosoma perso viene solitamente sostituito dalla copia del cromosoma rimanente e se quest'ultimo porta geni mutati si avrà una coppia di alleli mutati per quel gene; questo è quello che succede frequentemente quando si ha una condizione di omozigosi nel gene TP53 mutato.

Di per sé la mutazione su un singolo allele non causa gravi problemi, ma la buona copia potrebbe scomparire ed essere rimpiazzata dalla copia dell'allele mutato portando a perdita di eterozigosi (LOH) ed acquisizione di omozigosi per la mutazione con conseguenti alterazioni funzionali.

Il meccanismo di regolazione del ciclo cellulare p53-dipendente in un contesto normale prevede il mantenimento di bassi livelli della proteina stessa tramite regolazione a feedback negativo. In relazione al contesto specifico, p53 può variabilmente indurre l'arresto del ciclo cellulare, l'apoptosi o la senescenza in una condizione di stress, danno al DNA, ipossia aumentando i suoi stessi livelli cellulari.

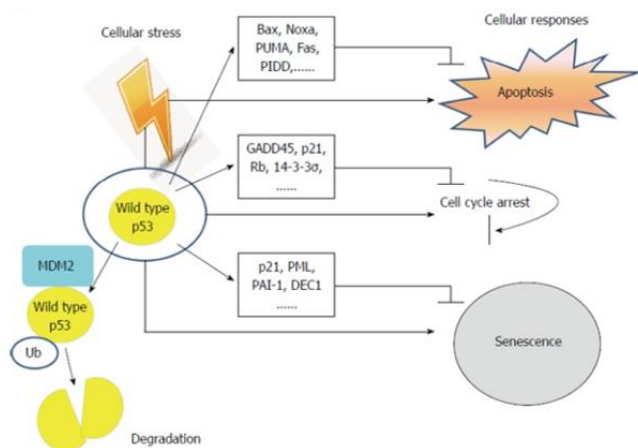


Figura 5. Funzione del soppressore tumorale p53. In condizioni normali p53 attiva una grande varietà di geni coinvolti in diversi processi biologici in risposta allo stress cellulare. (Li et al., 2015)

La morte cellulare può essere innescata mediante via intrinseca (apoptosi mitocondriale) ed estrinseca (recettori Fas con domini di morte). Nel primo caso p53 induce la trascrizione di geni appartenenti alla famiglia Bcl-2 codificanti per proteine pro-apoptotiche, principalmente Bax, Noxa e PUMA; questa regolazione positiva è accompagnata dalla regolazione negativa di una proteina appartenente alla

membrana mitocondriale con ruolo nella sopravvivenza cellulare, Bcl-2, rendendo la membrana permeabile in modo da veicolare la fuoriuscita del citocromo C che, legando Apaf-1, attiva la via delle caspasi come innesco dell'apoptosi. Mentre, la via estrinseca attivata da p53 vede il coinvolgimento dei recettori di morte (Fas) portanti domini di morte citoplasmatici che complessano con la capsasi-8 la quale lega a sua volta la capsasi-3 portando la cellula verso morte.

La progressione del ciclo cellulare è strettamente controllata da cicline e chinasi ciclina-dipendenti (CDK). P53, in condizione di stress, induce l'arresto del ciclo cellulare tramite la regolazione trascrizionale di p21^{WAF1}, appartenente alla famiglia di inibitori CDK, ostacolando la transizione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S. Inoltre, p53 arresta anche il passaggio dalla fase G2 alla fase M reprimendo CDC2, il CDK necessario per l'inizio della mitosi.

In risposta a danni al DNA indotti da stress p53, fosforilato dalle proteine ATM e ATR, induce la cellula ad entrare in senescenza; questo meccanismo è una forma specifica di arresto del ciclo cellulare prolungato, irreversibile e molto importante per prevenire lo sviluppo di cellule potenzialmente cancerose (41).

Instabilità dei microsatelliti (MSI) e sindrome di Lynch

Il 15% dei CRC non presenta instabilità cromosomica ma presenta difetti nel meccanismo di riparazione del mismatch (MMR), un componente della riparazione del DNA. Questo si verifica nei soggetti affetti da CRC ereditario non poliposico (HNPCC).

Quando il meccanismo di riparazione MMR è alterato nelle sue componenti si ottiene instabilità dei microsatelliti che consiste nel cambiamento in lunghezza di sequenze ripetute di DNA non codificante (1-5 coppie di basi ripetute 15-30 volte) per inserimento o cancellazione di unità ripetute (42). Questa mancata riparazione delle discrepanze nelle ripetizioni determina un cambiamento della lunghezza dei microsatelliti con un tasso molto più elevato del normale durante la replicazione del DNA portando a MSI.

La maggior parte dei tumori del colon-retto possiede MSI o CIN, ma non entrambi.

La metilazione delle isole CpG nella tumorigenesi

L'epigenetica ha un ruolo chiave nell'omeostasi di un tessuto e nella regolazione delle sue funzioni in quanto preserva lo sviluppo embrionale, la stabilità genomica e il differenziamento (43).

Le isole CpG sono regioni non codificanti presenti nei promotori dei geni e sono ricche di CG (44). La metilazione delle isole CpG (CIMP), presente nel 50% dei geni umani costituisce un meccanismo di regolazione epigenetica, tuttavia non sempre è vantaggioso per la cellula sana.

Infatti, molti dinucleotidi CpG ipermetilati nelle cellule tumorali causano un non necessario silenziamento dell'espressione trascrizionale di geni specifici, come i geni oncosoppressori (45).

La metilazione delle isole CpG sembra essere tessuto specifica e sembra essere diversa nel CCR. I tumori possono essere classificati anche in base al grado di metilazione e, quelli con alto grado (CIMP) sono caratterizzati da instabilità epigenetica. I vari CIMP sembrano mostrare anche una diversa epidemiologia e istologia (46).

1.4 Clinica

La sintomatologia del tumore del colon-retto è classicamente definita come aspecifica in quanto molto di frequente i sintomi vengono riscontrati in una fase avanzata della patologia neoplastica, è inoltre possibile il riscontro di sintomi variabili in relazione al tratto intestinale interessato (47).

- Colon sinistro: i tumori che insorgono in questa sede sono nella maggior parte dei casi stenosanti, caratteristica compatibile con il ridotto diametro rispetto al colon destro che va a determinare un quadro sintomatologico più frequentemente di tipo ostruttivo. La sintomatologia è caratterizzata da:
 - Modifica dell'alvo: spesso minima e con alternanza di stipsi e diarrea;
 - Presenza di sangue occulto nelle feci: quantità da modesta a copiosa spesso in associazione all'emissione di muco;
 - Dolore addominale: sintomatologia aspecifica e a carattere intermittente con localizzazione prevalente ai quadranti inferiori o diffusa a tutto l'addome.
- Colon destro: le lesioni che si sviluppano in questa sede secondariamente al lume maggiore vanno a costituire masse vegetanti, di grandi dimensioni e ulcerate con sintomatologia molto vaga e aspecifica (48):
 - Anemia: fenomeno cronico secondario alla costante perdita di sangue dalla superficie neoplastica con rara evidenza di sangue nelle feci. Essendo il processo cronico andrà ad attivare meccanismi di adattamento portando a diagnosi più tardiva in quanto i sintomi tipici dell'anemizzazione quali astenia e palpitazioni verranno raramente riscontrati se non tardivamente;
 - Dolore: gravativo e sub-continuo;
 - Massa palpabile presente nelle fasi molto avanzate della patologia;
 - Anoressia e dimagrimento.
- Retto: neoplasie prevalentemente vegetanti ed ulcerate caratterizzate dalla presenza di una sintomatologia più specifica conseguente al calibro ridotto che permetterà una diagnosi precoce:
 - Tenesmo: sensazione di incompleto svuotamento a seguito dell'evacuazione sensazione dovuta ad una possibile infiltrazione dell'elevatore dell'ano;
 - Rettorragia: emissione di sangue rosso vivo anche in grande quantità durante o dopo la defecazione;
 - Dolore perineale.

1.5 Screening

Lo screening organizzato per il cancro del colon-retto costituisce un programma di intervento di salute pubblica rivolto alla popolazione a rischio medio per età che ha dimostrato una riduzione della mortalità mediante l'esecuzione di test mirati all'individuazione precoce e all'eventuale rimozione di polipi (adenomatosi o serrati) o alla diagnosi precoce di CRC.

Studi randomizzati sono andati a dimostrare come la ricerca del sangue occulto (RSOF) e la rettosigmoidoscopia (RSS) sono due test di provata efficacia nel ridurre la mortalità per CRC di circa il 14% e il 28% (49) rispettivamente a dispetto di chi non esegue il test.

In Italia il programma di screening prevede l'esecuzione biennale in soggetti di età compresa tra i 50 e i 69 anni oppure l'esecuzione della RSS una sola volta in un'età compresa tra i 55 e i 64 anni, si osservano importanti differenze nell'aderenza tra Nord, Centro e Sud per quanto riguarda sia l'estensione sia gli inviti all'adesione (50).

	Nord				Centro				Sud - Isole			
	2011 2012	2013 2014	2015 2016	2017	2011 2012	2013 2014	2015 2016	2017	2011 2012	2013 2014	2015 2016	2017
Adesione grezza all'invito	51%	52%	52%	52%	41%	38%	36%	35%	26%	28%	24%	24%
Proporzione di persone con test positivo	4,3%	4,6%	4,6%	4,7%	4,7%	5,2%	5,1%	5,3%	5,2%	6,5%	6,2%	7,2%
Tasso di identificazione dei carcinomi	1,4‰	1,2‰	1,1‰	1‰	1,6‰	1,6‰	1,9‰	1,5‰	2,2‰	2,1‰	1,9‰	1,6‰
Tasso di identificazione degli adenomi avanzati	8,3‰	7,6‰	7,2‰	6,8‰	8,2‰	8,4‰	9,9‰	8,3‰	6,9‰	7,1‰	7,4‰	4,7‰

Figura 6. Outcome dei programmi con ricerca del sangue occulto fecale per macroarea 2011-2017. Età 50-69 anni.

La RSOF è il test comunemente utilizzato come metodica di screening in quanto costituisce un esame semplice, di facile esecuzione, di basso costo ma poco specifico e sensibile, laddove venga riscontrata una positività il soggetto sarà invitato ad eseguire una colonscopia totale metodica caratterizzata da una maggiore sensibilità diagnostica anche a dispetto della RSS, a scapito di una ridotta accettabilità.

Esistono diversi tipi di test per la RSOF, si è passati dal test al guanico degli studi degli anni 80-90 che sfruttava l'attività perossidasi dell'eme, al test immunoistochimico attualmente

utilizzato. Quest'ultimo (FIT) utilizza anticorpi specifici al fine di rilevare la globina ed è più efficace in termine di risultati sanitari e di costi a dispetto del test al guanico (51).

Quattro studi di fase 3 hanno dimostrato con un totale di circa 400000 soggetti randomizzati sottoposti a RSOF verso nessun intervento una riduzione della mortalità nei soggetti sottoposti a controllo pari a circa il 15-33%. Tale beneficio è stato stimato al 14-16% in due revisioni Cochrane (52-53).

Una minoranza dei soggetti è esclusa dalle normali tempistiche e modalità del piano di screening 'classico', i pazienti affetti da forme di carattere genetico.

I pazienti affetti dalla sindrome poliposica multipla classica a partire dai 10-12 anni e fino ai 50 anni dovranno sottoporsi a sigmoidoscopia annuale mentre i pazienti con forma attenuata della suddetta patologia dovranno effettuare colonscopie a cadenza annuale a partire dai 15-25 anni e sospensione indefinita.

Per quanto concerne i pazienti affetti da sindrome di Lynch il piano di screening sarà più stringente non solo nel settore colico bensì in tutte le sedi laddove si sia dimostrata un'aumentata incidenza di formazioni neoplastiche.

Le strategie per lo screening in questi pazienti sono:

- Colonscopia a partire dai 20-25 anni con intervallo di 1-2 anni;
- Visita ginecologica, ecografia transvaginale e determinazione di Ca125 a partire dai 30-35 anni con intervallo di 1-2 anni;
- Gastroduodenoscopia a partire dai 30-35 anni con intervallo di 1-2 anni;
- Ultrasonografia retrovescicale e citologia urinaria a partire dai 30-35 anni con intervallo di 1-2 anni.

1.6 Diagnosi

L'esame fondamentale in grado di mettere in atto la diagnosi è la pancolonscopia, può essere condotta ambulatorialmente con opportuna sedazione ed è necessaria la visualizzazione fino al cieco. È considerato un esame di qualità ottenere la visualizzazione di tutto il colon nel 90% dei casi.

Il rischio di perforazione è molto esiguo e pari allo 0.1% mentre la mortalità si attesta intorno allo 0.01-0.03% dati che devono essere dichiarati al paziente, la sensibilità dell'esame è pari al 96-97% e la specificità del 98%.

In caso di lesioni stenosanti tuttavia il rischio di perforazione incrementa di pari passo con la gravità della stenosi l'RX diretta addome o il clisma opaco con Gastrografin possono essere presi in considerazione laddove ci sia una stenosi per una prima valutazione tuttavia non permettono l'esecuzione di un esame biotico considerato fondamentale per la diagnosi, il gold standard comprende infatti la pancolonscopia in associazione all'esame biotico (54-55).

In alternativa alla pancolonscopia si può impiegare la rettosigmoidoscopia associata alla TC colon tuttavia nel 30% dei casi è comunque necessaria la colonscopia.

L'esame istologico della neoformazione del colon dovrebbe essere sempre disponibile prima dell'intervento chirurgico, può essere omessa unicamente in casi ben selezionati laddove la neoformazione non sia ben raggiungibile con l'endoscopia.

I marcatori tumorali non possono essere utilizzati per una diagnosi precoce tuttavia l'antigene carcinoembrionario e il Ca 19.9 hanno un ruolo nella stadiazione pre-operatoria, follow-up post resezione e valutazione della risposta terapeutica. A seguito dell'intervento è attesa la negativizzazione del valore dei marcatori tumorali tuttavia laddove si vengano ad osservare un aumento dei marcatori è possibile sospettare la presenza di metastasi occulte (56). L'aumento del CEA ha inoltre un VPP per recidiva di malattia dell'80-90% quindi laddove durante il follow-up venga riscontrato un incremento del valore del marcatore in associazione a TC negativa è consigliata l'esecuzione della PET\TC con FDG.

1.7 Inquadramento diagnostico

1.7.1 Classificazione

La classificazione secondo Dukes modificata secondo Aster-Coller è ormai desueta quindi viene raccomandato l'utilizzo della classificazione TNM-AJCC 2017 (57).

CLASSE	DESCRIZIONE
TX	Tumore primitivo non definibile
T0	Tumore primitivo non evidenziabile
Tis	Carcinoma in situ: intraepiteliale o invasione della lamina propria [comprende cellule tumorali confinate all'interno della membrana basale ghiandolare (intraepiteliale) o della lamina propria (intramucosa) che non raggiungono la sottomucosa]
T1	Tumore che invade la sottomucosa, senza arrivare alla muscolare propria.
T2	Tumore che invade la muscolare propria.
T3	Tumore con invasione attraverso la muscolare propria nella sottosierosa o nei tessuti pericolici e perirettali non ricoperti da peritoneo
T4	Tumore che invade direttamente altri organi o strutture e/o perfora il peritoneo viscerale o aderisce a strutture ed organi adiacenti.
T4a	Tumore che perfora il peritoneo viscerale
T4b	Tumore che invade direttamente altri organi o strutture o aderisce direttamente a strutture ed organi adiacenti.
NX	Linfonodi regionali non valutabili
N0	Non metastasi nei linfonodi regionali
N1	Metastasi in 1-3 linfonodi regionali (dimensione del tumore nel linfonodo ≥ 0.2 mm) o evidenza di depositi tumorali satelliti nella sottosierosa o nei tessuti non peritonealizzati pericolici e perirettali senza evidenza di metastasi linfonodali regionali
N1a	Metastasi in 1 linfonodo
N1b	Metastasi in 2-3 linfonodi
N1c	Depositi tumorali satelliti nella sottosierosa o nei tessuti non peritonealizzati pericolici e perirettali senza evidenza di metastasi linfonodali regionali
N2	Metastasi in 4 o più linfonodi regionali

CLASSE	DESCRIZIONE
N2a	Metastasi in 4-6 linfonodi
N2b	Metastasi in 7 o più linfonodi
MX	Metastasi a distanza non accertabili
M0	Assenza di metastasi a distanza
M1	Metastasi a distanza o peritoneali
M1a	Metastasi confinate ad un organo (fegato, polmone, ovaio, linfonodi extraregionali) senza metastasi peritoneali
M1b	Metastasi in più di un organo senza metastasi peritoneali
M1c	Metastasi peritoneali con o senza metastasi in altri organi.

Figura 7. TNM-AJCC 2017

1.7.2 Stadiazione

Include tre criteri inerenti all'estensione della malattia neoplastica T (tumor), all'interessamento delle stazioni linfonodali locoregionali N (node) e alla possibile presenza di lesioni ripetitive a distanza M (metastasis). Grazie alla combinazione dei suddetti criteri è possibile definire la stadiazione della malattia.

STADIO	DESCRIZIONE
Stadio 0	T _{is} N0M0
Stadio I	T1N0M0
	T2N0M0
Stadio IIa	T3N0M0
Stadio IIb	T4aN0M0
Stadio IIc	T4bN0M0
Stadio IIIa	T1-2, N1a-c, M0
	T1, N2a, M0
Stadio IIIb	T3, T4a, N1a-c, M0
	T2-3, N2a, M0
	T1-2, N2b, M0
Stadio IIIc	T4a, N2a M0
	T3-T4a, N2b, M0
	T4b, N1-2, M0
Stadio IVa	Ogni T, ogni N, M1a
Stadio IVb	Ogni T, ogni N, M1b
Stadio IVc	Ogni T, ogni N, M1c

Figura 8. Stadiazione 'Linee guida AIOM 2019'

La stadiazione può essere considerata quale importante fattore prognostico in quanto vi è una proporzionalità indiretta tra l'aumentare dello stadio e la percentuale di sopravvivenza a 5 anni. È possibile infatti riscontrare un OS a 5 anni che varia dall'88% dello stadio I al 4% dello stadio IV.

1.7.3 Anatomia patologica

Aspetto macroscopico

Pur potendo assumere numerose conformazioni macroscopiche il tumore del colon-retto può essere macroscopicamente classificato come:

- Vegetante: neoformazione sessile che protrude nel lume intestinale con aspetto fungoide o a “cavolfiore”;
- Ulcerato: margini sollevati, irregolare e dal fondo sanioso;
- Infiltrante: presenta un’ulcerazione centrale e da un diffuso ed esteso ispessimento della parete, che può, in buona parte, essere ricoperta da mucosa normale; più frequentemente rappresenta la diretta evoluzione della forma vegetante o ulcerata;
- Anulare-stenosante: si estende per tutta la circonferenza intestinale e determina un restringimento del lume, la parete infiltrata è deformata e rigida.

Aspetto microscopico

Vi sono numerose varianti di carcinoma del colon tuttavia nella stragrande maggioranza dei casi (99%) si osservano adenocarcinomi le quali varianti possono venire ad essere differenziate in relazione all’aspetto microscopico e alla prognosi:

- Adenocarcinoma classico: forma tradizionale che si accresce formando ghiandole, riscontrata con maggior frequenza nel colon di sinistra rappresenta la diretta evoluzione dell’adenoma, la suddetta categoria contiene la maggior parte dei tumori del colon;
- Adenocarcinoma mucinoso o colloide: più del 50% del tumore produce muco, la localizzazione è più frequente a destra e viene a riconoscere frequentemente come patogenesi l’instabilità microsatellitare;

- Adenocarcinoma con cellule ad anello con castone: istotipo caratterizzato da importante aggressività e capacità infiltrativa;
- Carcinoma midollare: istotipo poco differenziato, con ricco infiltrato linfocitario legato a mutazioni dei geni del MMR e che insorge soprattutto nel colon di destra; come il carcinoma mucinoso può essere riconnesso alla sindrome di Lynch.

1.8 Fattori prognostici e predittivi:

In tutte le patologie neoplastiche è possibile andare ad identificare dei fattori i quali possono essere definiti come ‘prognostici’ laddove la loro presenza possa ricondurre ad un outcome variabilmente migliore o peggiore o ‘predittivi’ laddove la loro presenza venga riconnessa ad un grado differente di risposta al trattamento.

La patologia neoplastica coloretale vanta diversi fattori di carattere prognostico, predittivo o prognostico-predittivo.

Tra i fattori prognostici abbiamo sicuramente i parametri appartenenti all’acronimo TNM quindi l’estensione, l’interessamento linfonodale e il riscontro di metastasi i quali collabiscono alla determinazione dello stadio della patologia neoplastica guida per il trattamento e per la definizione della prognosi.

La valutazione della positività linfonodale è acquisibile mediante l’asportazione di quantomeno 12 linfonodi al fine di scongiurare una determinazione nulla, ruolo emergente è ricoperto dal ‘Lymphnode ratio’ (LNR) il quale è definito come il rapporto tra il numero complessivo dei linfonodi positivi sul numero totale dei linfonodi asportati.

L’insorgenza di metastasi epatiche nell’ambito della neoplasia coloretale è sortibile di resezione chirurgica tuttavia i livelli di CEA riscontrati nel pre-operatorio laddove superino il valore di 5 ng/ml fungono da fattore prognostico negativo (58). L’invasione perineurale ha un notevole peso prognostico in quanto sottende ad una possibile invasione metastatica come confermato da una metanalisi che ha osservato come al pari di altri fattori questo vanta di un’importante correlazione con la ridotta sopravvivenza del paziente (59).

Tra i fattori prognostici negativi occorre citare anche l'eventuale presenza di occlusione o lo sviluppo di perforazione i quali costituiscono anche degli importanti fattori di morbidità e mortalità nei pazienti con patologia coloretale.

In aggiunta ai suddetti fattori vi sono dei biomarcatori tumorali nella neoplasia coloretale con potere prognostico e predittivo, la mutazione di RAS è presente in una percentuale dei pazienti pari al 56% questa assume un importante valore predittivo in quanto inabilita il possibile trattamento con i farmaci anti EGFR (60) mentre per quanto concerne un possibile ruolo prognostico gli studi sono discordanti (61).

La mutazione di BRAF è riscontrata in un 8-10% dei pazienti con carcinoma metastatico coloretale vanta una forte associazione con i tumori RAS wt (vige infatti un rapporto di mutua esclusività) e con l'instabilità microsatellitare. La presenza di tale mutazione, in particolare BRAF V600E nei pazienti in stadio II e III, è correlata in maniera forte con una prognosi negativa mentre per le altre mutazioni i risultati non sono concordi ma non sembra esserci un'associazione (62-63).

L'amplificazione di HER2 è riscontrabile in un 3-4% dei pazienti con carcinoma coloretale metastatico e assume un ruolo predittivo in relazione alla mancata efficacia degli anti EGFR e all'osservazione che vede una PFS nettamente inferiore nei soggetti con l'amplificazione (64-65).

L'instabilità microsatellitare si osserva in un 15-20% dei tumori del colon-retto ed è fortemente associato con la mutazione di BRAF assumendo dunque un ruolo predittivo quanto prognostico in quanto correlato alla risposta al trattamento con inibitori del check point immunitario (66) e ad una prognosi migliore sebbene laddove vi sia la mutazione di BRAF V600E è possibile riscontrare un sottogruppo con prognosi relativamente peggiore (67-68). La mutazione di PIK3CA è presente nel 14% dei pazienti con carcinoma coloretale e codifica per una proteina fondamentale per il pathways di trasduzione del segnale di mTOR e la sua mutazione di correla ad una prognosi sfavorevole.

La mutazione di p53 è tra le 5 riscontrate con maggiore frequenza nelle cellule neoplastiche il range mutazionale varia dal 14.4% dei tumori endocrini al 43.28% dei tumori colorettali. La mutazione di p53 funge da chiave nel processo trasformatore da adenoma a adenocarcinoma, la presenza della suddetta mutazione promuove la proliferazione cellulare, la migrazione e l'invasione di tessuti grazie a numerosi meccanismi. È nota l'associazione

della mutazione con la presenza di invasione vascolare e linfatica così come l'evasione dai normali meccanismi di controllo avvalorandosi come fattore prognostico sfavorevole (69).

1. 9 Trattamento:

Il trattamento pone le basi su una terapia di combinazione laddove, in relazione allo stadio, sarà possibile andare a combinare trattamento chirurgico e chemioterapico.

1.9.1 Malattia non metastatica:

La malattia non metastatica operabile comprende circa l'80% dei pazienti con cancro al colon-retto i quali sono operabili con malattia resecabile radicalmente, il 35% di questi recidiva e nell'80% dei casi avviene nell'arco dei primi tre anni.

Il primo approccio terapeutico con intento curativo prevede la chirurgia radicale che dovrebbe essere eseguita nel minor arco temporale possibile dalla diagnosi, la tecnica chirurgica deve essere considerata in base all'anatomia e alla condizione oncologica. Il chirurgo è un importante "fattore" prognostico in quanto il volume operatorio del chirurgo e dell'equipe in cui lavora è collegato a mortalità chirurgica, complicanze peri-operatorie e prognosi (70).

È possibile stabilire dei punti chiavi per garantire la radicalità oncologica della chirurgia colica:

- Il limite minimo accettabile di margine libero per considerare la radicalità chirurgica è fissato a 2 cm rispetto al margine inferiore della neoplasia (71-72);
- Nelle resezioni coliche destre o trasverse va effettuata la legatura dei vasi ileocolici, colici destri o colici medi alla radice del mesocolon, l'asportazione dei linfonodi apicali comporta una valutazione prognostica più accurata per il paziente. Nelle resezioni del colon sinistro è prevista la legatura dei peduncoli colico sinistro e sigmoidei ed analoga linfadenectomia; in quelle del sigma la legatura dell'arteria mesenterica inferiore dopo l'origine della colica sinistra è ritenuta sufficiente per la radicalità;

- Nelle neoplasie del colon destro la linfadenectomia standard deve comprendere i linfonodi ileo-colici e quelli del ramo destro dei colici medi, mentre in quelle del colon sinistro e sigma i linfonodi alla radice dell'arteria mesenterica inferiore (73);
- La necessità di una resezione in blocco degli organi adiacenti infiltrati, al fine di assicurare una resezione con margini liberi da malattia si presenta in circa il 3-5% dei carcinomi del colon. I tassi di mortalità specifica a 5 anni e recidiva locale sono significativamente più alti quando la resezione non viene eseguita in blocco ;
- La perforazione della neoplasia si osserva tra il 7,7 ed il 25%. Numerosi studi retrospettivi ne hanno documentato l'impatto prognostico;
- Le resezioni videolaparoscopiche offrono numerosi vantaggi, quali il minor dolore postoperatorio, la precoce ripresa dell'alimentazione e delle normali attività quotidiane ed il vantaggio estetico. Per il colon gli outcomes oncologici sono equivalenti alla tecnica laparotomica (74);
- Sull'eventuale tumore residuo e/o sulle metastasi è consigliabile eseguire sempre una biopsia.

Nello stadio I la chemioterapia adiuvante non è indicata in quanto determinante maggiori effetti collaterali rispetto ai benefici, nello stadio II è importante la valutazione del rapporto beneficio\danno in quanto non vi sono regole fisse e l'indicazione è controversa, la monochemioterapia con utilizzo di 5-FU determina un beneficio assoluto pari al 3-4% (75-76).

Nello stadio III i pazienti operati sono sempre candidati al trattamento adiuvante, ad eccezione dei pazienti in condizioni particolari, il quale ha dimostrato una riduzione del rischio relativo di morte pari al 33% con beneficio assoluto di sopravvivenza del 10-15%. Uno studio di ampie dimensioni in pazienti di stadio III ha dimostrato la pari efficacia del trattamento con capecitabina a dispetto di quello con acido folinico e 5-fluorouracile in bolo (77).

Laddove il soggetto presenti una buona PS con età inferiore ai 70 anni è possibile utilizzare un trattamento adiuvante polichemioterapico che preveda l'associazione di 5-FU, acido folinico e oxaliplatino o capecitabina e oxaliplatino (78-79).

Nei soggetti con basso rischio e ridotta PS lo studio Accent ha dimostrato un vantaggio marginale nell'utilizzo del trattamento di combinazione con oxaliplatino nei soggetti di età superiore ai 70 anni mentre il 5-FU ha dimostrato efficacia indipendentemente dall'età (80).

Il trattamento adiuvante è indicato nelle 6-8 settimane che seguono l'intervento chirurgico (in casi selezionati l'inizio può essere prorogato fino a 12 settimane) ha il fine di diminuire il rischio di recidiva (presente 1/3 dei pazienti) sterilizzando un possibile residuo micrometastatico a distanza, è sempre indicato laddove vi siano linfonodi positivi (in tutti i casi in stadio III) e in soggetti selezionati con linfonodi negativi ma con l'associazione di fattori di rischio che comportano un maggiore probabilità di recidiva: T4, G3, invasione linfo-vascolare, linfonodi esaminati in numero minore a 12 e la presenza di perforazione o occlusione.

La durata del trattamento adiuvante è pari a 6 mesi (81) sebbene lo studio IDEA (82) che includeva gli studi di fase III non abbia dimostrato importanti differenze mettendo a confronto un trattamento dalla durata classica rispetto ad un trattamento dalla durata di 3 mesi escludendo i soggetti N2 e T4 laddove si è dimostrata la superiorità del trattamento a 6 mesi. In base a quanto riportato dalle linee guida AIOM solo nell'N1a è possibile considerare un trattamento di 3 mesi (83).

È indicato l'impiego di un follow up intensivo in quanto si è dimostrato in grado di incrementare la sopravvivenza a discapito dell'esecuzione di esami unicamente in relazione all'insorgenza di sintomi. La durata standardizzata di follow up è pari a 5 anni in relazione alla percentuale del 95% dei soggetti la cui recidiva si dimostra entro i 5 anni (84-85). Non vi sono indicazioni universalmente condivise tuttavia il follow up prevede:

- Esame clinico ogni 4-6 mesi per i primi 3 anni e ogni 6 mesi nei 2 anni successivi
- Valutazione del CEA ogni 4-6 mesi per i primi 3 anni e ogni 6 mesi nei 2 anni successivi (86).
- Colonscopia a un anno dall'intervento e a 3 anni quindi a 5 laddove non vi sia un riscontro patologico (87).
- TC torace-addome ogni 6 mesi nei primi 3 anni e annualmente nei successivi 2 anni (88-89).

L'utilizzo della FDG-PET è stato studiato solo da uno studio randomizzato (90) che ha mostrato un vantaggio a favore di questa nell'identificare in anticipo la ripresa di malattia, tuttavia essendo uno studio di piccole dimensioni e interrotto anticipatamente le evidenze acquisite non sono sufficienti per sostenerne l'impiego nel programma di follow-up.

Il mantenimento di un corretto stile di vita nei pazienti "cancer survivors" va ad incidere nella prognosi del tumore coloretale, la dieta occidentale è risultata associata ad un più alto rischio di recidiva e di mortalità tra pazienti con stadio III trattati chirurgicamente con successiva terapia adiuvante (91).

La pratica costante di attività fisica riduce il rischio di recidiva, la mortalità specifica e quella complessiva nei pazienti con storia di tumore coloretale, una review sistematica ha sottolineato come praticare attività fisica prima o dopo la diagnosi va a ridurre la mortalità (92).

È ragionevole consigliare di praticare attività fisica nel corso della settimana di moderata intensità per 150 minuti o 75 minuti di attività di vigorosa intensità (93).

La malattia non metastatica localmente avanzata deve essere trattata chirurgicamente laddove determini una sintomatologia che vada ad impattare sulla qualità della vita, è possibile mettere in atto un approccio palliativo come l'utilizzo di bypass o protesi al fine di superare una condizione occlusiva. Il trattamento chemioterapico della patologia avanzata talvolta può permettere una regressione della neoplasia tale da determinare l'opportunità di un trattamento chirurgico curativo.

1.9.2 Malattia metastatica:

Tra 1/5 ed 1/7 dei pazienti con tumore coloretale presenta malattia metastatica all'esordio in aggiunta 1/3 nonostante il trattamento chirurgico andrà a sviluppare una recidiva.

Una volta superata la muscularis mucosae la neoplasia può esprimere la propria invasività a livello locale per contiguità, continuità e per disseminazione linfatica o a distanza. Quest'ultima è la via preferenziale di metastatizzazione del carcinoma coloretale ed avviene

temporalmente prima rispetto all'invasività locale, la sede più frequente di metastatizzazione è il fegato in relazione al drenaggio venoso di tipo portale che la rende primariamente interessata dall'attecchimento delle cellule neoplastiche. Considerando il tempo di comparsa è possibile differenziare le metastasi in sincrone (20-25%) le quali compaiono contemporaneamente alla diagnosi di tumore del colon o durante il trattamento adiuvante o metacrone (30-50%) laddove viene meno la contemporaneità dell'insorgenza.

Tra il 20-40% dei soggetti con tumore metastatico avrà metastasi limitatamente a livello epatico, cruciale è l'individuazione di coloro i quali pur presentando una condizione metastatica potranno giovare del trattamento chirurgico, vanno valutate per la chirurgia le metastasi a livello epatico, polmonare e ovarico.

In relazione alla possibilità di trattamento chirurgico e chemioterapico e all'avanzare della tecnica le metastasi epatiche possono essere trattate in una buona parte dei casi.

Al momento della comparsa delle metastasi si stima che circa il 15-20% rientri nella categoria di pazienti "resecabili", i limiti di resecabilità che permettono di definire un soggetto come facilmente resecabile sono: presenza di metastasi singola, dimensione inferiore ai 5 centimetri, N0 alla diagnosi, metastasi metacrone e DFS superiore ai 12 mesi e, infine, CEA inferiore a 100 ng/ml (94).

La resezione epatica R0 è l'unico mezzo terapeutico curativo con chances di sopravvivenza a 5 anni che variano dal 15 al 50% in relazione all'estensione e all'interessamento extraepatico. Il margine di resezione negativo costituisce un importante FPP seppur millimetrico per questo in concomitanza dell'intervento è routinario l'utilizzo dell'ecografia epatica al fine di una corretta stadiazione epatica e valutazione del rapporto con i peduncoli vascolari e biliari.

Laddove vi sia la necessità di eseguire un'epatectomia maggiore occorre considerare la valutazione volumetrica dell'ipertrofia compensatoria della restante porzione di fegato altrimenti sarà necessario approcciare la metastasi con il trattamento della patologia parzialmente resecabile.

Lo studio dell'EORTC (studio 40983) di Nordlinger basato su un approccio di trattamento peri-operatorio con FOLFOX per pazienti candidabili ad un intervento chirurgico per malattia metastatica a livello epatico rispetto alla sola chirurgia ha dimostrato un

significativo vantaggio per il braccio ricevente una terapia perioperatoria rispetto al braccio di sola chirurgia (95). Non è stato tuttavia osservato un incremento della sopravvivenza di conseguenza il trattamento deve essere valutato caso per caso.

COLORECTAL LIVER METASTASES Natural History			
	n	Median Survival (months)	5 year Survival (%)
Unresectable	921	6.9	0
Resectable, not resected	62	14.2	0
Resected, + margins	43	13.3	0
Resected, - margins	183	30.0	38

Br J Surg 1990, 77:1241

Figura 9. Br J Surg 1990 Nov; 77(11): 1241-6

I pazienti possono rientrare nella categoria con malattia potenzialmente resecabile in relazione alla presenza di fattori che rendano l'intervento biologicamente difficoltoso (metastasi multiple, dimensioni superiori ai 5 cm, N+ alla diagnosi, DFS < 12 mesi e CEA superiore 100 ng/ml) o tecnicamente difficoltoso (metastasi in prossimità della vena porta o richiesta di epatectomia maggiore).

I suddetti sono pazienti con alto rischio di recidiva, nasce quindi la disputa su quale sia il migliore schema chemioterapico da utilizzare: sebbene infatti siano approvati per questa indicazione farmaci chemioterapici come il 5fluorouracile ed il suo analogo orale, la capecitabina, l'Oxaliplatino e l'Irinotecan ed anticorpi monoclonali quali il Cetuximab o il Bevacizumab, esistono notevoli dubbi circa la combinazione migliore.

Doppiette chemioterapiche comprendenti una ulteriore aggiunta di Bevacizumab infatti hanno dimostrato un significativo vantaggio in termini di aumento di sopravvivenza globale, pur in assenza di significativi aumenti dei tassi di risposta in parte degli studi eseguiti. Ad esempio nel NO16966 di Saltz, (96) abbiamo tassi di risposta del 38% del braccio ricevente FOLFOX+Bevacizumab rispetto al 38% del braccio con solo FOLFOX.

Doppiette chemioterapiche con l'aggiunta di Cetuximab hanno invece mostrato significativi aumenti di tassi di risposta nei pazienti con status mutazionale k-ras wild type (con range 45-60%) pur in assenza in molti studi di un guadagno significativo in termini di impatto sulla sopravvivenza globale. La terza opzione, quella di una tripletta di chemioterapici, schema FOLFOXIRI, ha dimostrato ottimi risultati in termini sia di tassi di risposta (60%) sia in termini di guadagno di sopravvivenza globale, pur a discapito di un profilo di tossicità non trascurabile (97).

Infine, nei pazienti con malattia metastatica non resecabile e che probabilmente mai diventerà resecabile, l'approccio odierno è quello di programmare una strategia terapeutica che prevede l'impiego di tutti i farmaci a nostra disposizione.

Sappiamo infatti da analisi precedentemente pubblicate da Grothey che la sopravvivenza dei pazienti segue un andamento direttamente proporzionale con il numero di farmaci attivi ricevuti dal paziente. Tale sopravvivenza raggiunge una mediana di circa 24-28 mesi nei pazienti trattati con tutti i farmaci.

Malattia metastatica: trattamento di fase avanzata

Il 20% dei pazienti si presentano con malattia avanzata alla diagnosi mentre il 35% dei pazienti trattati con intento curativo andrà a sviluppare la malattia avanzata. Gli obiettivi del trattamento della malattia metastatica prevedono:

- Guarigione in un numero limitato di casi;
- Aumento della sopravvivenza;
- Scopo palliativo laddove vi sia la presenza di sintomi a carattere meccanico;
- Miglioramento della qualità di vita;
- Ritardo nella progressione della patologia;
- Diminuzione della dimensione neoplastica.

Nel processo decisionale dell'approccio terapeutico la caratterizzazione molecolare ha assunto ruolo fondamentale nella programmazione terapeutica dei pazienti con malattia metastatica. La presenza di mutazioni somatiche nei geni KRAS e NRAS è infatti un meccanismo di resistenza agli anticorpi monoclonali anti EGFR pertanto l'analisi è indispensabile.

La presenza di mutazioni RAS determina l'attivazione costitutiva di una delle principali vie di trasmissione dell'EGFR rendendo inefficace il blocco del recettore (98).

Mutazioni dell'esone 2 KRAS (codoni 12 e 13) sono associate a resistenza alla terapia anti EGFR in pazienti con carcinoma del colonretto metastatico in studi randomizzati con cetuximab o pannitumab in monoterapia o associati a chemioterapia (99).

Due metanalisi hanno confermato il valore predittivo negativo delle mutazioni di KRAS esone 2 dimostrando un chiaro vantaggio derivante dall'impiego di farmaci anti EGFR nei soli pazienti privi di mutazioni a livello dell'esone 2 di KRAS (100-101).

In circa il 15-20% dei casi KRAS esone wild type sono tuttavia presenti altre mutazioni meno frequenti di KRAS (esone 3 e 4) e di NRAS (esoni 2,3 e 4) a tale riguardo è stata condotta una metanalisi degli studi randomizzati che hanno valutato l'impatto delle nuove mutazioni di RAS sulla efficacia della terapia anti EGFR, la metanalisi ha incluso gli studi OPUS, COIN, CRYSTAL, PRIME, PICCOLO, FIRE 3, 20020408 e PEAK.

Questa ha dimostrato che il trattamento determina un PFS ed una OS superiore nei pazienti senza mutazioni rispetto ai tumori presentanti le "nuove" mutazioni inoltre lo studio ha dimostrato nessun beneficio in termini di sopravvivenza nei soggetti con qualsiasi mutazione di RAS (102). Sulla base di questi risultati EMA ed AIFA hanno ristretto l'impiego di Pannitumab e Cetuximab ai soli pazienti RAS wild type (in assenza quindi delle mutazioni negli esoni 2,3 e 4 di KRAS e NRAS).

Le mutazioni BRAF sono presenti in circa il 10% dei pazienti con carcinoma del colon retto e nei pazienti metastatici sono spesso associate a localizzazione nel colon destro e presenza di metastasi al peritoneo e a livello dei linfonodi a distanza (103), numerosi studi sono concordi nell'identificare la mutazione BRAF V600E quale fattore prognostico sfavorevole in pazienti con carcinoma del colon retto metastatico in quanto associato a ridotta sopravvivenza post-recidiva (104-105).

La valutazione dell'eventuale ruolo predittivo della mutazione BRAF V600E rispetto alle terapie anti EGFR ha portato risultati contrastanti tuttavia l'analisi della suddetta mutazione può fornire informazioni prognostiche e dovrebbe essere eseguita nella pratica clinica prima di intraprendere un trattamento di prima linea.

Trattamento di prima linea

La prima azione da eseguire in presenza di una patologia metastatica non resecabile è la definizione dell'espressione di BRAF e RAS quindi la valutazione dello stato clinico del soggetto suddividendo i pazienti in FIT e UNFIT di modo tale da poter definire il programma terapeutico.

In presenza di paziente FIT con riscontro di BRAF e RAS wild type la strategia terapeutica prevedrà l'ausilio di FOLFOXIRI o FOLFIRI in associazione a farmaci anti-EGFR (cetuximab o panitumab) o anti-VEGF (bevacizumab). L'associazione di cetuximab con FOLFOX a paragone con il trattamento chemioterapico (con e senza bevacizumab associato) è stata valutata mediante una metanalisi comprendente 7 studi la quale non ha riportato alcuna differenza significativa dell'impatto del trattamento con anti-EGFR (106). Studiata anche l'associazione di panitumab al regime FOLFOX e FOLFIRI rispettivamente nello studio PRIME (107) e nello studio Kohne (108) che hanno mostrato risultati favorevoli. Nel trattamento di prima linea la capecitabina ha dimostrato efficacia pari al 5-FU in associazione con l'oxaliplatino (109) tuttavia dallo studio COIN (110) emerge che l'aggiunta di cetuximab al regime con capecitabina determina un aumento della tossicità gastrointestinale senza un vantaggio di outcome per tale motivo l'uso di anti-EGFR insieme alla capecitabina in combinazione con l'oxaliplatino non è consigliabile. L'utilizzo di bevacizumab in associazione alla chemioterapia è stato studiato verificando i risultati dei principali studi clinici racchiusi nella metanalisi di Chen (111) laddove sono stati considerati come outcome OS e PF, l'OS è immutata rispetto alla terapia classica mentre la PFS è notevolmente migliorata a dispetto dell'utilizzo del bevacizumab, il quale beneficio è stato verificato in particolar modo con l'associazione alla capecitabina.

Devono tuttavia essere esclusi i pazienti con storia di TIA, ipertensione non controllata, diatesi emorragica, patologie della coagulazione e rischio di perforazione. Nello studio TRIBE (112) è stata valutata l'associazione di FOLFOXIRI con bevacizumab in pazienti non precedentemente trattati con buoni risultati, tale trattamento rappresenta quindi una valida opzione in pazienti in buone condizioni generali di età compresa tra i 18 e 75 anni ad eccezione dei soggetti precedentemente trattati con terapia adiuvante a base di oxaliplatino.

In presenza di paziente FIT con riscontro di RAS e BRAF mutati viene meno l'indicazione all'utilizzo di anti-EGFR e favore del trattamento con FOLFOXIRI o FOLFIRI in combinazione con bevacizumab.

In presenza di pz UNFIT lo studio AVEX (113) ha dimostrato la maggior efficacia della combinazione di biologico e chemioterapia a dispetto della chemioterapia singola. Lo studio ha indagato soggetti con età mediana intorno ai 76 anni e si è osservato un miglioramento della sopravvivenza libera da malattia con una mediana di 9,1 mesi nella terapia di combinazione a dispetto di 5,1 mesi del trattamento singolo. A fronte di una maggiore efficacia si evidenzia una sostanziale uguaglianza nella tossicità di grado 3 in ambedue i trattamenti tuttavia è più significativa per la combinazione la possibile insorgenza di un evento emorragico. Nel paziente anziano o unfit quindi il farmaco di scelta è la fluoropirimida in monoterapia preferibilmente associata a bevacizumab.

Trattamento di seconda linea

Nell'ambito della corretta gestione terapeutica della malattia metastatica colon-rettale laddove i pazienti presentino una progressione della malattia dopo un trattamento di prima linea dovrebbero essere sottoposti ad un trattamento di seconda linea qualora le condizioni generali lo consentano.

Vi è infatti la dimostrazione che la sopravvivenza si correla al numero di chemioterapici impiegati nel corso dell'evoluzione della malattia rendendo giustificato l'impiego della chemioterapia anche in linee successive. La scelta terapeutica è chiaramente influenzata dallo schema terapeutico utilizzato in prima linea, nel complesso la sopravvivenza globale è influenzata dall'esposizione del paziente a tutti i farmaci potenzialmente attivi nel corso della storia naturale della malattia.

Una recente metanalisi di Cochrane che ha preso in considerazione 34 trials randomizzati ha confermato che il trattamento farmacologico di seconda linea si associa ad un beneficio di sopravvivenza soprattutto se sono associati farmaci biologici inoltre il vantaggio si ottiene anche per il bevacizumab utilizzato in monoterapia.

Nei pazienti FIT con RAS e BRAF wild type il bevacizumab ha dimostrato attività ed efficacia anche come trattamento di II linea, sia nei pazienti non pretrattati sia in quelli pretrattati con farmaci anti-angiogenetici i dati rilevanti sono riassunti nella metanalisi di Mocellin (114) che ha dimostrato come, in assenza di controindicazioni, bevacizumab può essere impiegato in seconda linea in associazione alla chemioterapia.

Il bevacizumab ha inoltre dimostrato una maggiore sopravvivenza nei pazienti che proseguono il trattamento oltre la progressione, ciò è emerso dai risultati di due studi randomizzati (115-116).

L'associazione di aflibercept con FOLFIRI può essere considerata un'opzione nel trattamento di II linea in quanto nello studio VELOUR (117) si è andato a riscontrare un incremento significativo della sopravvivenza mediana globale e di sopravvivenza mediana alla progressione nel braccio contenente aflibercept tuttavia si è registrato anche un incremento delle tossicità tipiche degli antiangiogenetici quali ipertensione e fenomeni tromboembolici e della tossicità di grado 3-4 a livello gastrointestinale e midollare. In relazione all'assenza della mutazione di RAS e BRAF è possibile prendere in considerazione l'utilizzo di farmaci anti-EGFR; il cetuximab può essere impiegato in monoterapia in pazienti con tumore RAS wt pretrattati con i citotossici convenzionali (118).

Laddove i pazienti pretrattati non abbiano ricevuto cetuximab o abbiano sviluppato una reazione infusionale determinante per la sospensione il panitumab può essere utilizzato in monoterapia (119), può inoltre essere associato al trattamento con FOLFIRI (120).

Se nel trattamento di I linea è stato utilizzato il folfirinox è possibile valutarne la reintroduzione nel trattamento di II linea.

Laddove RAS e BRAF sono mutati viene meno la possibilità dell'utilizzo di farmaci biologici consigliata la chemioterapia alternativa rispetto alla I linea con il bevacizumab o FOLFIRI in associazione con l'aflibercept in pazienti che hanno ricevuto OXA e FOLFOXIRI come trattamento di I linea. Possibile somministrare FOLFOXIRI se già utilizzato in prima linea andando a valutare l'entità e la durata della risposta.

Nei pazienti UNFIT RAS e BRAF mutati occorre considerare la combinazione di encorafenib, cetuximab e binimetinib in uso compassionevole in II e III linea nei pazienti i quali mostrano la mutazione BRAF V600E (121) così come nei soggetti FIT è possibile approcciare un trattamento di combinazione che prevede chemioterapici e bevacizumab, laddove il paziente non sia candidabile ad altre terapie disponibili è possibile considerare l'utilizzo di regorafenib o TAS-102. Nei pazienti che sono stati sottoposti a tutti i trattamenti citotossici e biologici efficaci può essere considerato l'uso del regorafenib, un inibitore multichinasico o della trifluridina\tipiracil un antimetabolita analogo alle fluoropirimidine (122-123).

Se RAS e BRAF sono wild type occorre considerare l'utilizzo del farmaco biologico in associazione a chemioterapia citotossica o l'uso di bevacizumab o laddove refrattari regorafenib o TAS-102.

Trattamento linee successive:

Con RAS e BRAF wild type è possibile somministrare l'associazione di cetuximab con irinotecano o panitumab il quale è stato dimostrato poter essere impegnato in monoterapia in pazienti con tumore RAS wild type sottoposti a precedenti trattamenti chemioterapici in soggetti i quali non abbiano utilizzato precedentemente cetuximab o che lo abbiano sospeso in assenza di progressione per reazione infusionale. In pazienti refrattari possibile la somministrazione di regorafenib o TAS-102.

In presenza di RAS e BRAF mutati in pazienti indipendentemente FIT o UNFIT è possibile la somministrazione di regorafenib o di TAS-102.

1.9.3 Nuove prospettive di terapia: Immunoterapia

L'instabilità dei microsatelliti costituisce un marcatore fenotipico e molecolare del deficit del sistema di riparazione del DNA mismatch repair (dMMR) (16), quest'ultima guida la patogenesi di circa il 15% dei tumori del colon-retto e del 5% di quelli in stadio metastatico tuttavia solo nel 3% dei casi è correlata alla sindrome di Lynch mentre nei restanti casi è attribuita all'insorgenza di mutazioni de novo e quindi a forme sporadiche. L'instabilità dei microsatelliti influenza positivamente la prognosi negli stadi precoci di malattia modificata solo in parte dallo status di BRAF mentre nello stadio metastatico tale vantaggio sembra perdersi in associazione ad una verosimile intrinseca chemio-resistenza (124).

Il difetto funzionale a carico del MMR causa l'accumulo di mutazioni genetiche durante la replicazione incrementando in tal modo il carico mutazionale e neo-antigenico da cui deriva una potenziata risposta immunitaria endogena e una correlata sensibilità all'immunoterapia (125). I pazienti che non presentano instabilità microsatellitare risultano essere il 95% circa del totale dei soggetti affetti da carcinoma coloretale metastatico e non sembrano trarre beneficio dall'immunoterapia, perlomeno da sola.

La grande sfida della ricerca clinica è dunque estendere la fetta dei pazienti potenzialmente sensibili all'approccio immunoterapico oltre all'esigua percentuale dei tumori MSI high.

Farmaci citotossici come il 5-fluoracile e l'oxaliplatino così come la radioterapia possono modificare il microambiente tumorale andando a determinare una maggiore infiltrazione linfocitaria tramite l'induzione di morte cellulare e della conseguente presentazione antigenica e una conseguente maggior responsività al trattamento immunoterapico. Nello studio Checkmate 142 (66) si è andato a studiare il trattamento mediante l'associazione di nivolumab e ipilimumab a basse dosi in pazienti con instabilità microsatellitare (MSI-H), dMMR in soggetti con cancro colo-rettale metastatico. La combinazione ha dimostrato avere benefici di sopravvivenza risultato importante in quanto i soggetti con MSI-H hanno una ridotta sopravvivenza (14-19 mesi) rispetto a quelli non MSI-H (17-25 mesi) quando trattati con chemioterapia in prima linea (126).

Altri studi hanno approcciato lo stesso schema terapeutico utilizzando tuttavia ipilimumab ad alte dosi andando a gravare sul paziente un'importante tossicità, l'associazione dei due immunoterapici con ipilimumab a basse dosi potrebbe essere un potenziale trattamento di I linea in soggetti MSI-H.

1.10 LONSURF (TAS-102)

Lonsurf è un farmaco antitumorale prodotto dalla combinazione di trifluorotimidina (FTD) e un inibitore della timidina fosforilasi TPI aggiunto con lo scopo di inibire la degradazione di FTD in quanto la somministrazione orale del farmaco favorisce la degradazione della FTD, la TPI contrastando questo evento migliora l'azione e la resa della terapia (127).

È indicato in monoterapia per il trattamento di pazienti adulti affetti da carcinoma metastatico coloretale (CRC) precedentemente trattati e non considerati candidabili per il trattamento con le altre terapie disponibili tra cui la chemioterapia a base di fluoropirimidine, oxaliplatino, irinotecano, anti-VEGF ed anti-EGFR. È dimostrata l'indicazione anche per il trattamento del carcinoma gastrico e della giunzione gastroesofagea.

L'efficacia clinica e la sicurezza del Lonsurf sono state valutate da uno studio internazionale di fase III (RECOURSE) (123), randomizzato in doppio cieco controllato con placebo in soggetti con carcinoma coloretale metastatico precedentemente trattato.

L'endpoint primario di efficacia era la sopravvivenza globale (OS) e gli endpoint di supporto erano la sopravvivenza libera da progressione (PFS), il tasso di risposta globale (ORR) e il tasso di controllo della malattia (DCR). In totale 800 pazienti sono stati randomizzati 2:1 a ricevere Lonsurf in aggiunta alla migliore terapia di supporto o placebo sempre in associazione con il supporto.

Il dosaggio si basava sull'area della superficie corporea, il trattamento è stato somministrato due volte al giorno per cinque giorni a settimana per un totale di due settimane seguito quindi da 14 giorni di riposo e ripetuto ogni 4 settimane. Il trattamento è stato portato avanti fino a progressione della malattia o tossicità inaccettabili.

L'età media dei soggetti era di 63 anni con performance status da 0 a 1 e sito primario di malattia a livello del colon (62%) o il retto (38%), lo stato del gene KRAS era wild type (49%) o mutato (51%).

Il numero mediano delle linee di terapia precedenti per la patologia metastatica era pari a 3, tutti avevano ricevuto chemioterapia a base di fluoropirimidine, oxaliplatino e irinotecano. Tutti tranne 1 il bevacizumab e tutti i pazienti ad esclusione di 2 con tumori KRAS wild type avevano ricevuto cetuximab o panitumab.

L'analisi ha dimostrato un beneficio di sopravvivenza clinicamente e statisticamente significativo di Lonsurf a dispetto del placebo e una OS mediana di 7,1 mesi rispetto ai 5,3 del placebo con tassi di sopravvivenza ad un anno rispettivamente del 26,6% e 17,6%.

Grazie al primordiale studio di fase II giapponese e lo studio illustrato precedentemente il Lonsurf ha ottenuto il via libera in Europa, seppur il beneficio possa apparire modesto occorre considerare che il trattamento fornisce un'alternativa in un setting di pazienti molto difficili da trattare i quali sono già stati sottoposti a numerose linee di trattamento, considerando la facilità di reclutamento dei soggetti per gli studi è inoltre facilmente intuibile che la classe di pazienti è numerosa.

Un altro farmaco al pari del TAS-102 si inserisce come possibile trattamento in questo setting di pazienti: il regorafenib.

Il regorafenib è un farmaco biologico ad azione multitarget in quanto va ad agire su diverse proteinchinasi indispensabili per la crescita tumorale comprese le chinasi per l'angiogenesi (VEGFR), tumorigenesi (KIT, RET, RAF-1 e BRAF) e microambiente tumorale (PDGFR e EGFR).

L'efficacia dello Stivarga si è andata a studiare in particolar modo con lo studio CORRECT (122) il quale ha preso in analisi 760 pazienti con PS compreso tra 0 e 1 e età mediana di 61 anni stabilendo l'OS come parametro per la valutazione dell'efficacia. Tale studio ha dimostrato che il regorafenib rispetto al placebo determina un OS mediana di 6,4 mesi contro i 5 mesi del placebo.

Il farmaco viene eliminato principalmente per via epatica per questo tra gli effetti avversi più impattanti sulla salute del soggetto vi è la tossicità epatica, normalmente le alterazioni si sono dimostrate modeste con alterazione degli indici ALT e AST tuttavia in una piccola percentuale di casi si sono osservate delle alterazioni severe.

Tra le manifestazioni cliniche abbiamo anche: emorragie, infezioni, reazioni mano-piede e astenia.

Una metanalisi (128) è andata a confrontare l'efficacia del TAS-102 rispetto al regorafenib andando ad utilizzare come fonti PubMed, Medline, Embase, Scopus e Cochrane. È risultata una sostanziale corrispondenza dei due trattamenti in relazione ai parametri OS e PS definiti per validare l'efficacia del farmaco, tuttavia il regorafenib ha mostrato un numero maggiore di effetti collaterali contestualmente al suo utilizzo.

Da ciò deriva che nel decidere quale dei due farmaci somministrare è molto importante una valutazione multi-disciplinare tenendo in considerazione tutte quelle che sono le comorbidità del paziente.

I due farmaci possono venire ad essere somministrati in maniera sequenziale, uno studio italiano (129) ha osservato come laddove il paziente sia già stato sottoposto a regorafenib e abbia dimostrato una buona risposta al trattamento sarà una condizione predittiva positiva per il trattamento con il TAS-102.

Le reazioni avverse al TAS-102 sono raggruppate in relazione alla frequenza nella tabella sottostante considerando i gruppi di frequenza in base alla seguente convenzione: molto comune ($> 1/10$); comune ($> 1/100$ e $< 1/10$) e non comune ($> 1/1000$ a $< 1/100$).

Tabella: Reazioni avverse riportate negli studi clinici in pazienti trattati con TAS-102.

<i>Classificazione per sistemi e organi (secondo MeDRA)</i>	<i>Molto comune</i>	<i>Comune</i>	<i>Non comune</i>
Infezioni ed Infestazioni		Infezione delle vie respiratorie inferiori	Shock settico Enterite infettiva Infezione polmonare Infezioni del tratto biliare Influenza Infezione del tratto urinario
Tumori benigni, maligni e non specificati (cisti e polipi compresi)			Dolore da cancro
Patologie del sistema emolinfopoietico	Neutropenia Leucopenia Anemia Trombocitopenia	Neutropenia febbrile Linfopenia	Pancitopenia Granulocitopenia Monocitopenia Eritropenia Leucocitosi Monocitosi
Disturbi del metabolismo e della nutrizione	Diminuzione dell'appetito	Ipoalbuminemia	Disidratazione Ipeglicemia Iperkalemia
Disturbi Psichiatrici			Ansia Insonnia
Patologie del sistema nervoso		Disgeusia Neuropatia periferica	Neurotossicità Disestesia Iperestesia Ipoestesia
Patologie dell'occhio			Acuità visiva ridotta Visione offuscata Diplopia Cataratta
Patologie dell'orecchio e del labirinto			Vertigini Fastidio all'orecchio
Patologie gastrointestinali	Diarrea Nausea Vomito	Dolore addominale Costipazione Stomatite Disturbo orale	Enterocolite emorragica Emorragia gastrointestinale Ascite Ileo subileo Colite Gastrite Reflusso

Patologie vascolari			Embolia Ipertensione Rossore
Patologie respiratorie, toraciche e mediastiniche		Dispnea	Embolia polmonare Versamento pleurico Rinorrea Disfonia
Patologie epato-biliari		Iperbilirubinemia	Epatotossicità Dilatazione biliare
Patologie della cute e del tessuto sottocutaneo		Sindrome da eritrodisestesia palmo-plantare Eruzione cutanea Alopecia	Esfoliazione della pelle Orticaria Reazione di fotosensibilità
Patologie del sistema muscoloscheletrico e del tessuto connettivo			Gonfiore delle articolazioni Artralgia Dolore osseo Mialgia Spasmi muscolari
Patologie renali e urinarie		Proteinuria	Insufficienza renale Cistite non infettiva Disturbi della minzione
Patologie dell'apparato riproduttivo e della mammella			Disturbi mestruali
Patologie sistemiche e condizioni relative alla sede di somministrazione	Affaticamento	Piressia Edema Infiammazione delle mucose Malessere	Deterioramento dello stato di salute fisica generale Dolore Sensazione di cambiamento della temperatura corporea Xerosi
Esami diagnostici		Aumento degli enzimi epatici Aumento della fosfatasi alcalina nel sangue Diminuzione di peso	Aumento della creatinina ematica Prolungamento del QT all'elettrocardiogramma Aumento del rapporto internazionale normalizzato.

Le reazioni avverse laddove sia possibile devono essere evitate o trattate prontamente:

➤ Tossicità midollare:

Il TAS-102 provoca un incremento dell'incidenza della mielosoppressione con sviluppo di: anemia, neutropenia, leucopenie e trombocitopenia.

La conta completa delle cellule del sangue deve essere effettuata prima dell'inizio della terapia e in base alla necessità e al fine di monitorare la tossicità, l'esecuzione della conta è imprescindibile prima di ogni trattamento.

Il trattamento non può iniziare laddove la conta assoluta dei neutrofili risulti $< 1,5 \times 10^9/L$, piastrine $< 75 \times 10^9/L$ o laddove il paziente mostri una tossicità non ematologica clinicamente rilevante di grado 3 o 4 non risolta e secondaria a precedenti terapie. A seguito del trattamento sono state riportate infezioni gravi secondariamente alla suddetta soppressione del midollo osseo, le condizioni dei pazienti devono essere costantemente monitorate in modo tale da prendere misure adeguate in queste condizioni come la somministrazione di agenti antimicrobici e del fattore stimolante le colonie di granulociti (G-CSF) come clinicamente indicato. Nello studio RECOURSE il 9,4% dei pazienti ha ricevuto a seguito del trattamento con TAS-102 il G-CSF.

➤ Tossicità gastrointestinale:

I pazienti che sviluppino nausea, vomito e diarrea devono essere attentamente monitorati con impiego di anti-emetici, anti-diarroici ed altre misure come la terapia sostitutiva di liquidi/elettroliti. Modifiche della dose devono essere considerate.

➤ Compromissione renale:

L'uso non è indicato nei pazienti con compromissione renale severa o malattia renale allo stadio terminale in quanto non è stato studiato in questi soggetti, mentre l'incidenza degli eventi avversi è simile in condizioni di normale funzionalità renale e nei sottogruppi con compromissione lieve. È stata tuttavia dimostrata una maggiore sensibilità a TAS-102 nei pazienti con compromissione renale moderata rispetto ai soggetti con funzionalità normale.

Capitolo 2

Introduzione, Pazienti e Metodi

2.1 Introduzione e scopo dello studio

Il TAS-102 è stato approvato nel 2018 in Italia per il trattamento dei pazienti con carcinoma del colon-retto metastatico e precedente refrattarietà a due linee di trattamento. Come dimostrato da due trial che hanno portato alla registrazione del farmaco (123-130) circa il 40% dei pazienti ottiene il ‘disease control’ (assenza di progressione tumorale) alla prima valutazione radiologica.

Come precedentemente enunciato il TAS-102 presenta un buon profilo di tossicità e una buona concordanza tra i risultati dei trial e i risultati clinici (131-132). Si osserva tuttavia una mancanza di fattori predittivi per l’efficacia del farmaco.

La trifluridina vanta un uso consolidato nella pratica medica tra le fluoropirimidine ed è somministrata da più di tre decenni (133). Il suo uso in ambito oncologico è relativamente recente in quanto prima dell’associazione con il Tiripacil (farmaco in grado di inibire l’enzima timidilato fosforilasi e implementare la persistenza a livello sanguigno della trifluridina) l’emivita di questa era di poche ore, limitandone l’utilizzo nel setting anti-neoplastico.

Il farmaco può agire in maniera non dissimile rispetto al 5-FU, ambedue infatti determinano un’inibizione dell’enzima timidilato sintasi a seguito di un’esposizione prolungata. L’enzima timidilato sintasi è in grado di catalizzare la reazione che prevede la conversione della deossiuridina monofosfato a deossitimidina monofosfato essenziale per la sintesi di DNA: l’inibizione di questo determina uno squilibrio dei deossinucleotidi con conseguente accumulo di deossiuridina, fattore in grado di danneggiare il DNA (134).

D’altra parte, è possibile che il meccanismo d’azione del farmaco sia maggiormente correlato all’incorporazione a livello del DNA tumorale: questa ipotesi viene suggerita dalla documentata maggior efficacia del farmaco somministrato in dosi ripetute intervallate da periodi di pausa a discapito della somministrazione continua (quest’ultima agisce con maggior inibizione della timidilato sintasi, risultando in una aumentata morte cellulare) (135-136).

Infatti, in modelli preclinici è stato dimostrato come l'FTD induca una fosforilazione di Ck1 in Ser345, seguito da accumulo ed incremento di p53 e p21 a livello delle cellule tumorali, inducendo un arresto della proliferazione mitotica in fase G2 a cui segue il decremento della ciclina B1 e soppressione di CCNB1 e CDK1. FTD sembra quindi agire principalmente mediante la massiva incorporazione nel DNA (137).

Ciò implica che la presenza di p53 wild type sia necessaria per ottenere la morte delle cellule neoplastiche trattate con TAS-102 e/o l'induzione dell'arresto mitotico p53 correlato nelle cellule con massima incorporazione del TAS-102.

Lo scopo della nostra analisi era quello di valutare se lo status mutazionale e l'espressione di p53 fosse associato con una maggiore probabilità di ottenere il controllo di malattia in soggetti trattati con TAS-102, andando quindi ad attribuire un ruolo non solo prettamente prognostico al p53 per l'evoluzione della malattia, ma allo stesso modo anche predittivo di risposta al farmaco.

2.2 Pazienti e metodi.

2.2.1 Pazienti

Sono stati arruolati pazienti trattati presso la clinica di Oncologia dell'A.O.U Ospedali Riuniti di Ancona – Università Politecnica delle Marche, eleggibili per lo studio in quanto sottoposti a trattamento monoterapico con TAS-102 per carcinoma del colon-retto metastatico.

I pazienti dovevano essere stati trattati qualora eleggibili per le indicazioni del farmaco il quale è indicato, al di fuori del trial clinico, per il trattamento dei pazienti con MCRC che si sono dimostrati precedentemente refrattari e due differenti regimi di trattamento chemioterapico.

Abbiamo raccolto i dati relativi alla risposta al trattamento antineoplastico osservata nella prima rivalutazione radiologica a seguito del suddetto, la data di inizio del trattamento e della progressione neoplastica, la data della morte (o dell'ultimo follow up laddove i pazienti risultavano non deceduti al tempo dello studio).

Tra i fattori di stratificazione presenti anche il sesso (uomo vs donna), età (< o $\geq$ 75 anni), performance status all'inizio del trattamento (0 vs 1 vs 2), alterata funzione renale (in quanto il Tipiracil presenta metabolismo prevalentemente renale) i pazienti sono stati stratificati in relazione alla clearance della creatinina (< o $\geq$ 60 ml/min), precedenti linee di trattamento per la patologia metastatica (2 vs 3 o maggiori), K-ras/N-ras/B-raf mutati o wild type e per concludere trattamento con Regorafenib. (si vs no).

2.2.2 Metodi: analisi statistica

La stima della sopravvivenza è stata calcolata mediante il metodo di Kaplan-Meier mentre le variabili di sopravvivenza in relazione ai fattori di stratificazione considerati sono state valutate grazie al Log-Rank test. Il confronto è stato valutato con Fisher's Exact per le variabili binomiali e Chi-Square per le restanti. L'analisi multivariata è stata eseguita con il modello di regressione di Cox.

Il livello di significatività statistica è stato posto con $p < 0,05$.

Le variabili prese in esame sono state la linea di trattamento, PS all'inizio del trattamento e lo stato mutazionale di K-ras/B-ras/N-ras. Allo stesso modo sul gruppo di controllo è stata eseguita l'analisi mutazionale di p53 per definire se p53 possieda unicamente valore prognostico o allo stesso modo un valore predittivo.

2.3 Metodi: analisi anatomo-patologica

La valutazione dello stato mutazionale di p53 è stata eseguita mediante l'analisi immunoistochimica, la quale sfrutta la maggiore stabilità delle proteine mutate le quali non essendo degradate si accumulano a livello nucleare potendo essere evidenziate con la suddetta metodica di colorazione. Nei tessuti laddove è assente la mutazione di p53 la colorazione non è rilevabile, il cut-off del nostro studio è stato posto con una colorazione di almeno il 20% delle cellule e due differenti anatomopatologi hanno osservato l'immunoistochimica in doppio cieco sia per l'outcome del paziente sia per l'opinione espressa dall'altro anatomopatologo.

Capitolo 3

Risultati

3.1 Caratteristiche della coorte in studio:

Nel periodo compreso tra Marzo 2019 e Gennaio 2020 sono stati arruolati 37 pazienti per lo studio.

<i>Variabile</i>	<i>Numero di pazienti (%)</i>
<i>Sesso</i>	Uomini 27/37 (73%) Donne 10/37 (27%)
<i>Età (range 44-83 anni)</i>	<75 anni 30/37 (81%) >75 anni 7/37 (19%)
<i>Clearance della creatinina</i>	>60 ml/min 25/37 (67%) <60 ml/min 12/37 (33%)
<i>ECOG Performance Status</i>	0: 17/37 (46%) 1: 10/37 (27%) 2: 10/37 (27%)
<i>Mutazione K-Ras N-Ras</i>	Wild type 14/37 (38%) Mutato 23/37 (62%)
<i>Linea di trattamento</i>	III linea 25/37 (66%) Linee successive 12/37 (34%)
<i>Regorafenib</i>	

Stato mutazione p53

Prima del trattamento con TAS 102:

15/37 (40%)

Dopo il trattamento con TAS 102:

9/37 (24%)

Mutato 20/37 (54%)

Wild type 17/37 (46%)

20/37 pazienti erano di sesso maschile e la rimanente parte di sesso femminile 17/37. L'età media dei pazienti era di 68 anni (range 44-83 anni) con 7/37 (19%) di età superiore ai 75 anni. 25/37 (67%) dei pazienti presentavano una clearance della creatinina stimata come superiore ai 60 ml/min mentre i rimanenti 12/37 (33%) avevano un valore di clearance inferiore.

17/37 (46%) avevano un ECOG PS: 0 al momento dell'inizio del trattamento, 10/37 (27%) avevano un ECOG pari a 1 e il restante 10/37 (27%) aveva ECOG pari a 2.

14/37 (38%) presentavano K-ras\N-ras wild type mentre i restanti 23/37 (62%) mostravano variabilmente la mutazione di K-ras o N-ras, assenti i pazienti con mutazione di Braf tra quelli arruolati per lo studio. La maggior parte dei pazienti aveva ricevuto il TAS 102 quale trattamento di terza linea per malattia metastatica 25/37 (66%). Il TAS-102 è stato sfruttato in un range di trattamento che va dalla terza alla sesta linea. 15/37 (40%) avevano ricevuto regorafenib prima del trattamento con TAS 102 mentre 2/37 (24%) lo avevano ricevuto a seguito del trattamento con il TAS-102. Infine, 20/37 (54%) presentavano una mutazione del p53 contro il restante 17/37 (46%) con p53 wild type. In termini di risposta al farmaco in 1 paziente si è osservata risposta parziale alla prima rivalutazione TC, 12 pazienti presentavano patologia stabile e 22 progressione di malattia. Al momento dell'inizio dell'analisi 2 pazienti avevano già eseguito l'indagine TC. 13/35 (37%) avevano raggiunto il controllo di malattia, la PFS media in questo gruppo era pari a 3,87 mesi (95%CI:3.41-19.082). 32/37 (86%) sono andati incontro a progressione di malattia durante il follow-up. Il valore di OS mediano per l'intero gruppo era pari a 10,95 mesi (95%CI: 8.06-20.131). 19/37 (51%) sono morti nell'arco temporale del follow-up.

3.2 Analisi statistica

Impatto della variabile p53 wild type vs mutato in termini di PFS.

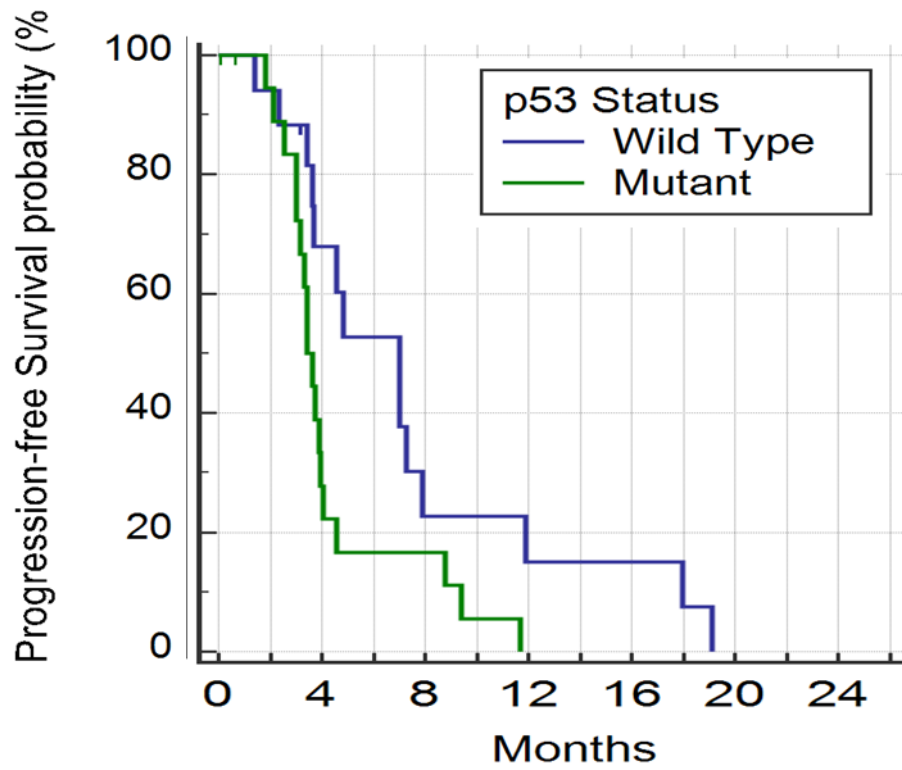


Figura 12. Curva di sopravvivenza Kaplan-Meier. PFS della coorte di pazienti con p53 wild type (curva blu) o mutato (curva verde).

Abbiamo studiato il differente valore di PFS posto in relazione alla presenza di p53 wild type vs mutato. La PFS nei pazienti p53 wild type era pari a 6,98 mesi contro i 3,44 mesi con p53 mutato (HR per progressione 0.48, 95%CI: 0.23-0.97, $p=0.035$). Dal grafico ricavato dall'analisi dei dati in nostro possesso tramite lo stimatore di Kaplan-Meier è possibile osservare l'effettivo discostamento statisticamente significativo.

Impatto della variabile p53 wild type vs mutato in termini di OS.

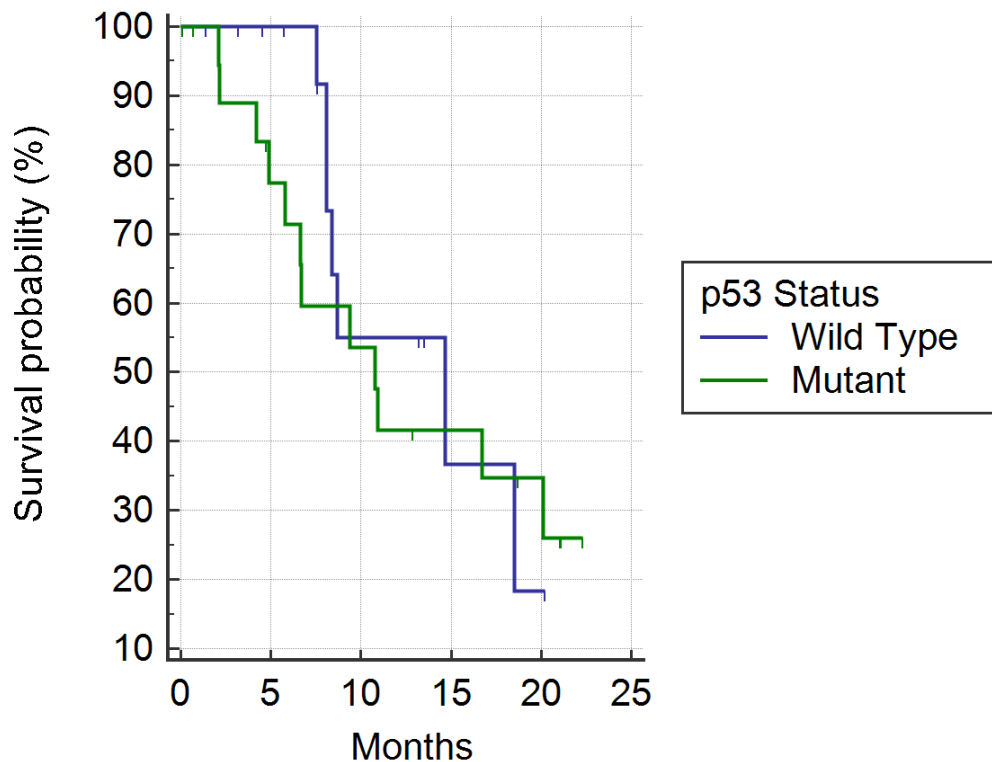


Figura 9. Curva di sopravvivenza Kaplan-Meier. OS della coorte di pazienti con p53 wild type (curva blu) o mutato (curva verde).

La curva e le analisi non mostrano una differenza statisticamente significativa in termini di OS in relazione alla variabile p53 wild type/mutato, è tuttavia possibile apprezzare la presenza di differenti incroci delle due curve di sopravvivenza. In relazione a quest'ultima affermazione è possibile ipotizzare che la causa dipenda dall'estrema eterogeneità dei trattamenti ricevuti a seguito del TAS-102.

In ogni caso è apprezzabile una differenza nella mediana di sopravvivenza di 14.65 mesi in pazienti wild type contro 10.75 mesi per i pazienti con p53 mutato, tuttavia la differenza non è statisticamente significativa ($p=0.065$).

Impatto del PS all'inizio del trattamento in termini di OS.

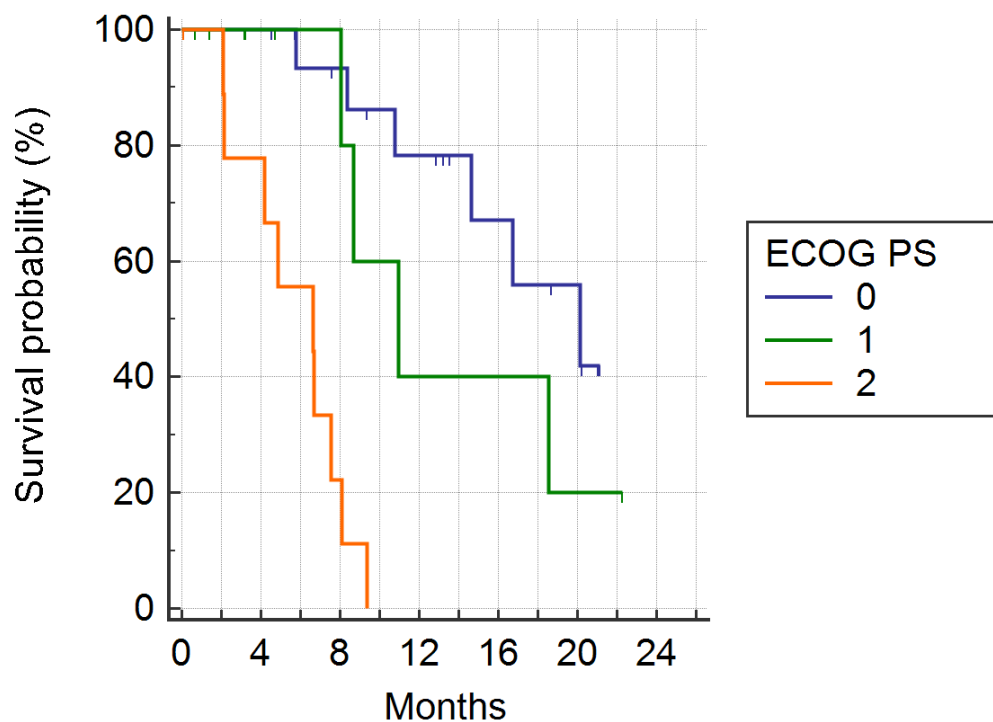
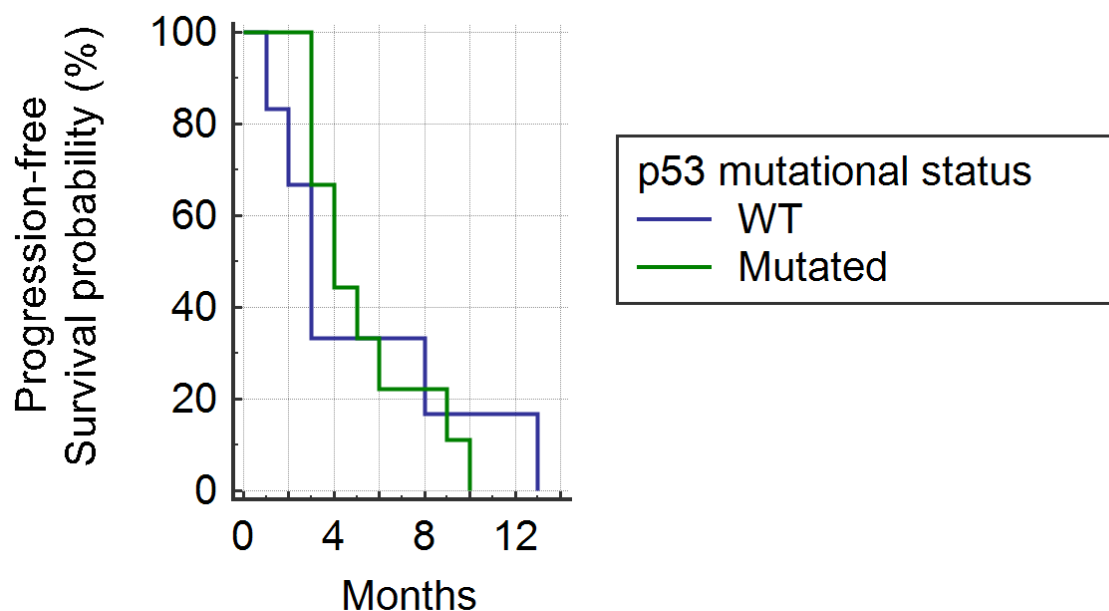


Figura 10. Curva di sopravvivenza Kaplan-Meier. PFS in relazione all'ECOG alla diagnosi 0 (curva blu), 1 (curva verde) e 2 (curva arancione).

Il PS del gruppo è stato valutato mediante la scala ECOG la quale assume valori da 0 a 5 in relazione alle prestazioni del paziente. La PFS dei trattati stratificata in relazione alle condizioni generali si è dimostrata significativa.

I pazienti sono stati suddivisi in 3 gruppi e le differenze di sopravvivenza sono rispettivamente in relazione alla mediana di sopravvivenza 20.131 mesi (ECOG 0) vs 10.951 (ECOG 1) vs 6.623 mesi (ECOG 2) con $p=0.0001$.

Impatto della somministrazione di regorafenib in relazione alla variabile p53 wild type vs mutato in termini di PFS.



Number at risk

Group: WT

6 4 2 2 1 1 1 0

Group: Mutated

9 9 4 2 2 0 0 0

Abbiamo selezionato tra la coorte iniziale di 37 pazienti un sottogruppo pari a 15 persone alle quali era stato somministrato anche il regorafenib.

Andando a stratificare il sottogruppo per la variabile p53 mutato vs wild type, come osservabile dalle curve di Kaplan Meier, non è possibile riscontrare una sostanziale differenza di PFS ($p=0.769$).

Impatto dei restanti fattori di stratificazione sull'outcome in termini di DCR, PFS e OS.

<i>Variabile</i>					<i>p value</i>
<i>Sesso</i>	DCR	D: 55%	U: 44%		p = 0.247
	PFS	D: 4.95	U: 3.86		p = 0.552
	OS	D: 8.31	U: 14.65		p = 0.115
<i>Età</i>	DCR	>75 aa: 57%	<75 aa 32%		p = 0.383
	PFS	>75 aa: 7.01	<75 aa: 3.69		p = 0.884
	OS	>75 aa: 8.09	<75 aa: 14.65		p = 0.093
<i>Linee di trattamento</i>	DCR	2: 33%	3+: 45%		p = 0.707
	PFS	2: 3.67	3+: 7.01		p = 0.252
	OS	2: 9.37	3+: 18.52		p = 0.238
<i>Regorefenib (S\N)</i>	DCR	S: 36%	N:38%		p = 1
	PFS	S: 3.73	N: 3.96		p = 0.765
	OS	S: 18.52	N: 10.75		p = 0.441
<i>RAS (wild type vs mutato)</i>	DCR	Wt: 36%	M: 38%		p = 1
	PFS	Wt: 3.63	M: 4.06		p = 0.367
	OS	Wt: 10.75	M: 10.95		p = 0.626
<i>Clearance creatinina (< o > 60 ml\min)</i>	DCR	< 27%	>42%		p = 0.478
	PFS	< 3.96	>3.86		p = 0.776
	OS	< 10.75	>10.95		p = 0.891
<i>ECOG</i>	DCR	2: 11%	1: 3.42	0: 6.62	p = 0.034
	PFS	2: 33%	1: 4.06	0: 10.95	p = 0.088
	OS	2: 53%	1: 4.59	0: 20.13	p < 0.0001

Capitolo 4

Discussione

Dalla sua introduzione nella pratica clinica il TAS-102, complice il favorevole profilo di tossicità, ha determinato il moltiplicarsi delle pubblicazioni inerenti al suo uso nella pratica clinica.

La maggior parte delle analisi pubblicate si sono focalizzate su problemi quali la tollerabilità del farmaco e la possibilità di utilizzarlo con risultati soddisfacenti in differenti setting clinici (131-132).

Sono tuttavia riscontrabili dei punti di debolezza in questa opzione di trattamento quali l'assenza di marker predittivi adeguati dell'efficacia e le prestazioni relativamente modeste del farmaco in un setting di risposta radiologica (con risposte molto ridotte se non assenti).

Ponendo la base sul concetto del 'continuum of care', la questione della corretta scelta di somministrazione del farmaco nei pazienti eleggibili anche ad altre linee di trattamento quali ad esempio il regorafenib e la possibilità del rechallenge anti EGFR con biopsia liquida a definire Ras wild type vs mutato, diventa cruciale.

In relazione a quanto affermato l'identificazione dei pazienti maggiormente in grado di beneficiare del trattamento con TAS-102 assume un ruolo centrale al fine di ottimizzare le decisioni terapeutiche in particolare in questo setting di pazienti con gravità di patologia molto avanzata.

La maggior parte dei dati a nostra disposizione si concentra maggiormente su questioni cliniche a dispetto delle caratteristiche biologiche o dei biomarcatori di efficacia, indice di un'indiretta dimostrazione della mancata conoscenza sull'effettivo meccanismo di funzionamento del farmaco.

Proprio al fine di colmare tale lacuna, in questo studio in cui sono stati arruolati 37 pazienti affetti da carcinoma del colon retto metastatico trattati con TAS-102 si sono volute sottolineare le differenze in termini di DFS, PFS e OS tenendo conto di differenti variabili di stratificazione osservabili nei pazienti, ponendo appunto l'accento sul ruolo predittivo del p53 wild type o mutato nei pazienti trattati con TAS-102.

Per quanto concerne il valore predittivo del PS questo è stato già ipotizzato in studi precedenti (138-139) e la sua conferma assume quindi un ruolo cruciale nell'identificazione dei pazienti che potrebbero raggiungere un prolungamento della OS grazie al farmaco.

Nella nostra analisi, siamo stati in grado di confermare il risultato, ma è pur sempre vero che il PS è un fattore che incide indipendentemente quale fattore prognostico più che predittivo di risposta ad un farmaco specifico quale nel nostro caso il TAS-102, in relazione all'assunto che la situazione clinica dei pazienti all'inizio del trattamento non può che influire sull'outcome e pertanto non può assumere un ruolo decisionale nella scelta che preveda il confronto tra due (o più) trattamenti affidabili.

Diversi studi riferiscono una migliore efficacia del TAS-102 se somministrato in linee precedenti a dispetto del trattamento di ultima linea.

Ovviamente laddove il TAS-102 viene somministrato nelle linee precedenti sussiste una minor possibilità di riscontrare una patologia voluminosa con l'interessamento di diversi siti di coinvolgimento metastatico a discapito delle successive.

Di conseguenza la linea di trattamento potrebbe essere considerata quale una caratteristica prognostica (quanto per TAS-102 tanto per altri presidi) non avvalorandosi quindi come elemento fondamentale per l'approccio decisionale.

Sorprendentemente, l'istanza non è stata confermata nel nostro studio in quanto abbiamo osservato una maggiore tendenza all'incremento della OS per i pazienti in trattamento con il farmaco nella quarta linea o successive.

Tale differenza può essere attribuibile al fatto che i pazienti che raggiungono successive linee di trattamento siano andati incontro ad un processo di selezione a seguito della dipartita di quelli con malattia rapidamente progressiva.

Per quanto riguarda K-ras ed N-ras così come negli studi RESOURCE e TERRA, il loro stato mutazionale non ha determinato alcuna differenza in termini di efficacia del farmaco (123-130).

Nella coorte dei pazienti arruolati nessun paziente presentava la mutazione B-raf V600E forse proprio in relazione alla prognosi infausta dei pazienti con la suddetta mutazione e la conseguente impossibilità di raggiungimento di linee successive di trattamento.

Venendo allo scopo principale del nostro studio, cioè la dimostrazione del ruolo variabilmente prognostico o predittivo della mutazione di p53, sottolineiamo innanzitutto che è una condizione riscontrabile nel 40-50% dei pazienti affetti da carcinoma coloretale sporadico.

Sulla base di quanto riportato nello IARC tp53 database aggiornato nel 2018 la percentuale è pari al 43,28% ed è correlabile con valori incrementali di progressione e outcome negativo.

Il valore prognostico del suddetto marcatore è ben noto e riportato in numerosi studi clinici. Ciò che si è voluto comprovare nello studio dunque non risiede nel voler confermare la suddetta affermazione già ampiamente studiata, ma nell'identificarne il ruolo predittivo indice quindi di una buona risposta della neoplasia al trattamento con TAS-102 in relazione alla presenza o meno della mutazione.

A sostegno del valore predittivo del p53 vi è l'ipotesi che indica il meccanismo d'azione del TAS-102 riconducibile non tanto all'inibizione della timidilato sintasi bensì in relazione all'accumulo di p53 con conseguente blocco della mitosi nella cellula tumorale in fase G2, meccanismo d'azione possibile solo se in presenza di uno stato p53 wild type.

Focalizzandoci sui nostri risultati, questi sembrano confermare quanto enunciato dai modelli preclinici: la presenza di p53 wild type sembra correlarsi all'aumentata attività del farmaco o, per meglio dire, la presenza di p53 mutato sembra associarsi all'assenza di controllo della malattia nei pazienti trattati con TAS-102.

Questo fattore, come dimostrato dall'analisi multivariata, sembra essere indipendente dallo stato delle prestazioni del paziente.

In letteratura sono scarsi i dati inerenti a questo argomento che si aggiungano ai risultati di Matsuoka et al. (137) i quali costituiscono il modello preclinico alla base del nostro studio.

In un ulteriore articolo precedentemente pubblicato di Bijnsdrop et al (140) gli autori hanno raggiunto risultati completamente contrastanti.

In particolare mediante l'ausilio del saggio di Sulforodamina B e l'analisi FACS sulla base di un pannello di linee cellulari p53 wild type/mutato gli autori non sono stati in grado di dimostrare che la citotossicità e la morte cellulare siano state soggette all'influenza dello stato mutazionale di p53.

I nostri risultati mostrano invece che in pazienti con carcinoma del colon retto con p53 mutato tanto il tasso di controllo della malattia quanto la sopravvivenza libera da progressione appaiono significativamente peggiori a dispetto della popolazione wild type, a sostegno dell'idea che, sebbene una parte della morte cellulare possa essere riscontrata anche nelle cellule p53 mutate trattate con TAS-102, il minimo effetto clinico ottenuto potrebbe scoraggiare l'utilizzo del farmaco a favore di altri trattamenti a nostra disposizione.

Per le altre forme di fluoropirimidine (principalmente per 5-FU) altri studi hanno dimostrato il ruolo predittivo dello stato mutazionale di p53 (141-142).

Tuttavia vi sono ulteriori studi i quali risultati sembrano respingere la suddetta affermazione (143) a sostegno dell'idea che lo stato mutazionale di p53 non sia correlato alla differente efficacia del 5-FU.

Ad ulteriore riprova di quanto affermato dal nostro studio si è voluto valutare il valore predittivo del p53 per il regorafenib, trattamento fruibile nello stesso setting di pazienti rispetto al TAS-102.

In base ai risultati ottenuti nel sottogruppo di pazienti ai quali è stato somministrato anche il regorafenib in una linea precedente rispetto al trattamento con TAS-102 non siamo stati in grado di riscontrare alcuna differenza nei risultati (stratificati per PFS e DCR) sulla base del p53 wild type\mutato.

Consapevoli che questo fattore non sia sufficiente alla dimostrazione che lo stato wild type sia un fattore 'predittivo' dell'efficacia di trattamento con TAS-102, riteniamo che la differente correlazione di TAS-102 e regorafenib inerentemente allo stato mutazionale di p53 potrebbe suggerire l'ausilio di questo fattore molecolare per agevolare una scelta tra questi farmaci, ad oggi utilizzati nello stesso setting di pazienti.

Seppur con il limite di una coorte ridotta in relazione ai risultati ottenuti è possibile dedurre il valore predittivo di p53 inerentemente al trattamento con il TAS-102 con la volontà di andare ad ampliare la coorte in analisi.

Il nostro studio vuole quindi essere di ulteriore impulso alla conferma del possibile ruolo della valutazione di p53 nella pratica clinica per quanto concernente il setting dei pazienti con CRC metastatico pluritratati, non solo in relazione al suo noto valore prognostico ma al suo valore predittivo quindi decisionale a dispetto delle linee di trattamento fruibili.

Il nostro obiettivo è dunque quello di andare ad agire nel percorso decisionale di un setting di pazienti dove non vi è spazio per l'incertezza, costruendo le fondamenta per l'utilizzo di un marker noto con un nuovo significato.

Bibliografia

- 1) Associazioni Italiana Registri Tumori AIRTUM & Associazione Italiana di Oncologia medica AIOM. I numeri del cancro in Italia - 2019.
- 2) International Agency for Research on Cancer (WHO). Global Cancer Observatory (GCO). <https://gco.iarc.fr/>
- 3) www.demo.istat.com
- 4) Giovannucci E, Colditz G A, Stampfer M J, Willett W C Physical activity, obesity and risk of colorectal adenoma in women (United States). *Cancer Causes Control* 1996; 7(2): 253-63.
- 5) Ulrich C M, Himbert C, Holowatyj A N, Hursting S D Energy balance and gastrointestinal cancer: risk, interventions, outcomes and mechanisms *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018 ;15(11):683-98.
- 6) Carr P R, Weigl K, Edelmann D, Jansen L et al. Estimation of absolute risk of colorectal cancer based on healthy lifestyle, genetic risk, and colonoscopy status in a population based study. *Gastroenterology* 2020; S0016-5085(20)30337-1.
- 7) Chan S M, Lau R, Aune D et al. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS One*. 2011;6(6):e20456.
- 8) Giovannucci E Modified risk factors for colon cancer. *Gastroenterol Clin N Am* 2002; 31(4):925-43.
- 9) Giovannucci E, Stampfer M J, Colditz G A et al. Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the nurse's health study. *Ann Intern Med* 1998; 129(7):517-24.
- 10) Hill M. Dietary fibre and colon cancer: where do we go from here? *Proc Nutr Soc* 2003; 62(1):63-5.
- 11) Colditz GA et al. Physical activity, obesity, and reduced risk of colon cancer: implication for prevention. *Cancer Causes Control* 1997; 8:649-67.
- 12) Cho-Won K, Ryeo-Eun G, Hae-Miru L et al. Cigarette smoke extracts induced the colon cancer migration via regulating epithelial mesenchymal transition and metastatic genes in human colon cancer cells. *Environ Toxicol*. 2017; 32(2):690-704.
- 13) Frezza EE, Wachtel MS, Chiriva-Internati M. Influence of obesity on the risk of developing colon cancer. *Gut* 2006; 55(2):285-91.

- 14) Su LJ, Arab L. Alcohol consumption and risk of colon cancer: evidence from the national health and nutrition examination survey I epidemiologic follow-up study. *Nutr Cancer*. 2004; 50(2):111-9.
- 15) Strate LL, Syngal S Hereditary colorectal cancer syndrome *Cancer Causes and Control* 2005; 16:201-13.
- 16) Gelsomino, F; Barbolini, M; Spallanzani A; Pugliese G; Cascinu S. The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. *Cancer Treat. Rev*. 2016; 51:19–26.
- 17) Spigelman A D, Williams C B, Talbot I C et al. Upper gastrointestinal cancer in patients with familial adenomatous polyposis. *Lancet* 1989; 2:783-85.
- 18) Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, Godlee F, Stolar MH, Mulrow CD. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology* 1997; 112:594-642.
- 19) Yashiro M. Ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *Wold J Gastroenterology*. 2014; 20 (44):16389-97.
- 20) Click B, Pinsky P F, Hickey T, Doroudi M, Schoen R E. Association of colonoscopy adenoma findings with long-term Colorectal Cancer incidence. *JAMA*. 2018; 319 (19):2021-31.
- 21) Myers D J and Arora K. Villous adenoma. *StatPearls Publishing*; 2020-2019 PMID: 29262150.
- 22) Jae Hyun K, K. S. N, Hye Jung K et al. Assessment of colon polyp morphology: Is education effective? *World Journal of Gastroenterology* 2017; 23(34):6281-85.
- 23) Li D. Recent advances in colorectal cancer screening. *Chronic Dis Transl Med* 2018; 4(3):139-47.
- 24) Castells A. Hereditary forms of colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol*. 2016; 39 Suppl 1:62-67.
- 25) Yang V W. APC as a checkpoint gene: The beginning or the end? *Gastroenterology* 2002; 123(3):935-39.
- 26) Sievers C K, Grady W M, Halberg, R B and Pickhardt P J. New insights into the earliest stages of colorectal tumorigenesis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; 11(8):723-29.
- 27) Van Es J H, Giles R H, Clevers H C. The many faces of the tumor suppressor gene APC. *Exp Cell Res* 2001; 264(1):126-34.

- 28) Cherfilis, J and Zeghouf M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs', *Physiol Rev* 2013; 93(1):269-309.
- 29) Simanshu D K, Nissley D V, McCormick F. RAS proteins and therapy regulators in human disease. *Cell* 2017;170 (1):17-33.
- 30) Bos J L, Rehmann H and Wittinghofer A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 2007; 12(5):865-77.
- 31) Fernández-Medarde A and Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer* 2011; 2(3):344-58.
- 32) Macaluso M, Russo G, Cinti C, Bazan V, Gebbia N and Russo A. Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer. *J Cell Physiol* 2002; 192(2): 125-30.
- 33) Taylor S J and Shalloway D. Cell cycle-dependent activation of Ras. *Curr Biol*, 1996; 6(12):1621-7.
- 34) Fang J Y, Richardson B C. The MAPK signaling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2005; 6(5):322-7.
- 35) Yang S H, Sharrocks A D and Whitmarsh A J. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene* 2013; 513(1): 1-13.
- 36) Frank S A. Dynamics of cancer incidence, inheritance and evolution. Princeton University Press 2007. PMID: 20821846.
- 37) Korchynskiy, Stoika R, Funa K et al. Expression of Smad proteins in human colorectal cancer. *International Journal of Cancer* 1999; 82:197-202.
- 38) Manning A M, Williams A C, Game S M and Paraskeva, C. Differential sensitivity of human colonic adenoma and carcinoma cells to transforming growth factor beta (TGF-beta): conversion of an adenoma cell line to a tumorigenic phenotype is accompanied by a reduced response to the inhibitory effects of TGF-beta. *Oncogene* 1991; 6(8):1471-6.
- 39) Xiao L L, Jianbiao Z, Zhi-Rong C, Wee-Joo C. P53 mutation in colorectal cancer – molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterology* 2015; 21(1):84-93.
- 40) Saha, M. N., Qiu, L. and Chang, H. Targeting p53 by small molecules in hematological malignancies. *J Hematol Oncol* 2013; 6; pp. 23.
- 41) Salama R, Sadaie M, Hoare M and Narita M. Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev* 2014; 28(2):99-114.

- 42) Wheeler J B W, Mortensen N. DNA mismatch repair genes and colorectal cancer. *Gut* 2000; 47:148-53.
- 43) Lao V V and Grady W M. Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8:686-700.
- 44) Feinberg A P and Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983; 301:89-92.
- 45) Hughes L A, Khalid-de Bakker C A, Smits K M et al. The CpG island methylator phenotype in colorectal cancer: progress and problems. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1825:77-85.
- 46) Kaneda A and Yagi K. Two groups of DNA methylation markers to classify colorectal cancer into three epigenotypes. *Cancer Sci* 2011; 102:18-24.
- 47) Lynch B M, Baade P, Fritschi L et al. Modes of presentation and pathways to diagnosis of colorectal cancer in Queensland. *MJA* 2007; 186:288-91.
- 48) Thompson M R, Perera R, Senapati A, Dodds S. Predictive value of common symptom combinations in diagnosing colorectal cancer. *British Journal of Surgery* 2007; 94:1260-65.
- 49) Mandel J S, Bond J H, Church T R et al. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. Minnesota Colon Cancer Control Study. *N Engl J Med* 1993; 328:1365-71.
- 50) Lo screening coloretale: dati di attività dal 2009 al 2017. (<https://www.osservatorionazionale screening.it/content/lo-screening-coloretale>)
- 51) Quintero E. Chemical or immunological tests for the detection of fecal occult blood in colorectal cancer screening? *Gastroenterology Hepatol* 2009; 32(8):565-76.
- 52) Holme O, Bretthauer M, Odgaard-Jensen J et al. Flexible sigmoidoscopy versus faecal occult blood testing for colorectal cancer screening in asymptomatic individuals. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 1 (9) CD 009259.
- 53) Hewitson P, Glasziou P, Irwig L et al. Screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, Hemoccult. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; CD001216.
- 54) Byers T, Levin B, Rothenberger D et al. American Cancer Society guidelines for screening and surveillance for early detection of colorectal polyps and cancer: update 1997. American Cancer Society Detection and Treatment Advisory Group on Colorectal Cancer. *CA Cancer J Clin* 1997; 47:154-60.

- 55) Desch CE, Benson AB, Smith TJ et al. Recommended colorectal cancer surveillance guidelines by the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1312.
- 56) Bast RC, Jr., Ravdin P, Hayes DF et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001; 19:1865-78.
- 57) Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM). Linee guida tumori del colon -2019. (2019)
- 58) Arru M., Aldrighetti L, Castoldi E et al. Analysis of prognostic factors influencing long-term survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer. *World J Surg* 2008; 32(1):93-103.
- 59) Knijn N, Mogk S C, Teerenstra S, Simmer F, Nagtegaal I D. Perineural invasion is a strong prognostic factor in colorectal cancer: a systematic review. *Am J Surg Pathol* 2016; 40(1):103-12.
- 60) Normanno N, Tejpar S, Morgillo F, De Luca A, Van Cutsem E, Ciardiello F. Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6(9):519-27.
- 61) Gavin PG, Colangelo LH, Fumagalli D et al. Mutation profiling and microsatellite instability in stage II and III colon cancer: an assessment of their prognostic and oxaliplatin predictive value. *Clin Cancer Res* 2012; 18:6531-41.
- 62) Farina-Sarasqueta A, van Lijnschoten G, Moerland E et al. The BRAF V600E mutation is an independent prognostic factor for survival in stage II and stage III colon cancer patients. *Ann Oncol* 2010; 21:2396-2402.
- 63) André T, de Gramont A, Vernerey D et al. Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated 10-Year Survival and Outcomes According to BRAF Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study. *Journal of Clinical Oncology* 2015; 33:4176-87.
- 64) Sartore-Bianchi A, Trusolino L, Martino C et al. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open- label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17:738-46.
- 65) Martin V, Landi L, Molinari F et al. HER2 gene copy number status may influence clinical efficacy to anti-EGFR monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2013; 108(3):668–75.

- 66) Overman MJ, McDermott R, Leach JL et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2017 ; 18(9):1182-91.
- 67) Lochhead P, Kuchiba A, Imamura Y et al. Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105: 1151-56.
- 68) Sinicrope FA, Mahoney MR, Smyrk TC et al. Prognostic impact of deficient DNA mismatch repair in patients with stage III colon cancer from a randomized trial of FOLFOX-based adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2013; 31:3664-72.
- 69) Li X L, Zhou J, Chen Z R and Chang W J. P53 mutations in colorectal cancer-molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol*. 2015; 21(1):84-93
- 70) Di Cataldo A, Scilletta B, Latino R et al. The surgeon as a prognostic factor in the surgical treatment of rectal cancer. *Surg Oncol* 2007; 16 Suppl 1: S53-56.
- 71) Andreola S, Leo E, Belli F et al. Adenocarcinoma of the lower third of the rectum surgically treated with a <10-MM distal clearance: preliminary results in 35 N0 patients. *Ann Surg Oncol* 2001; 8:611-15.
- 72) Haas-Kock DF, Baeten CG, Jager JJ et al. Prognostic significance of radial margins of clearance in rectal cancer. *Br J Surg* 1996; 83:781-85.
- 73) Killeen S, Mannion M, Devaney A, Winter DC. Complete mesocolic resection and extended lymphadenectomy for colon cancer: a systematic review. *Colorectal Dis*. 2014; 16(8):577-94.
- 74) Kim JY, Han SJ, Jung Y et al. The relationship between local recurrence and positive lateral margin after en bloc resection of colorectal neoplasm. *Scand J Gastroenterol* 2018; 53:1541-46.
- 75) Benson AB, Schrag D, Somerfield MR et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22:3408-19.
- 76) Sobrero A. Should adjuvant chemotherapy become standard treatment for patients with stage II colon cancer? For the proposal. *Lancet Oncol* 2006; 7:515-516.
- 77) Twelves C, Wong A, Nowacki MP et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med* 2005; 352: 2696-2704.

- 78) Kuebler JP, Wieand HS, O'Connell MJ et al. Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP C-07. *J Clin Oncol* 2007; 25:2198-2204.
- 79) Haller DG, Tabernero J, Maroun J et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29(11):1465-71.
- 80) McCleary NJ, Meyerhardt JA, Green E, et al. Impact of age on the efficacy of newer adjuvant therapies in patients with stage II/III colon cancer: findings from the ACCENT database. *J Clin Oncol* 2013; 31(20):2600-6.
- 81) Andre T, Quinaux E, Louvet C et al. Phase III study comparing a semimonthly with a monthly regimen of fluorouracil and leucovorin as adjuvant treatment for stage II and III colon cancer patients: final results of GERCOR C96.1. *J Clin Oncol* 2007; 25(24):3732-38.
- 82) André T, Vernerey D, Mineur L et al. Three versus 6 months of oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy for patients with stage III colon cancer: disease-free survival results from a randomized, open-label, international duration evaluation of adjuvant (IDEA) France, phase III trial. *J Clin Oncol*. 2018; 36(15):1469-77
- 83) Grothey A, Sobrero AF, Shields AF et al. Duration of Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer. *N Engl J Med*. 2018; 378(13):1177-88.
- 84) Guyot F, Faivre J, Manfredi S, et al. Time trends in the treatment and survival of recurrences from colorectal cancer. *Ann Oncol* 2005; 16:756-761.
- 85) Seo SI, Lim SB, Yoon YS, et al. Comparison of recurrence patterns between ≤ 5 years and > 5 years after curative operations in colorectal cancer patients. *Surg Oncol*. 2013; 108(1):9-13.
- 86) Pita Fernandez S, Alhayek Ai M, et al. Intensive follow up strategies improve outcome in non metastatic colorectal cancer patient after curative surgery: a systematic review and meta-analysis *Ann Oncol* 2015; 26:644-56.
- 87) Kahi CJ, Boland CR, Dominitz JA, et al. Colonoscopy Surveillance After Colorectal Cancer Resection: Recommendations of the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2016; 150(3):758-68
- 88) Primrose JN, Perera R, Gray A et al. Effect of 3 to 5 years of scheduled CEA and CT follow-up to detect recurrence of colorectal cancer: the FACS randomized clinical trial. *JAMA* 2014; 311:263-70.

- 89) Meyerhardt JA, Mangu PB, Flynn PJ, et al. Follow-up care, surveillance protocol, and secondary prevention measures for survivors of colorectal cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline endorsement. *J Clin Oncol* 2013; 31:4465-70.
- 90) Sobhani I, Tired E, Lebtahi R, et al. Early detection of recurrence by 18FDG-PET in the follow-up of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2008 11; 98(5):875-80.
- 91) Van Blarigan EL and Meyerhardt JA. Role of Physical Activity and Diet After Colorectal Cancer Diagnosis. *JCO* 2015; 33(16):1825-34.
- 92) Schmid D, Leitzmann MF. Association between physical activity and mortality among breast cancer and colorectal cancer survivors: a systemic review and meta-analysis. *Annals of Oncology*, Volume 25, Issue 7, 2014, Pages 1293–1311.
- 93) NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). Survivorship Version 1.2019.
- 94) Bittoni A et al. *Crit Rev in Oncology/Hematology* 2013; 85:332-41.
- 95) Nordlinger B et al. Peri-operative 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 oncology* 2013; 14 (12):1208-15.
- 96) Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin. Oncol*. 2008; 26:2013-19.
- 97) Falcone A. et al. Phase III trial of infusione fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compare with infusione fluorouracil, leucovorin and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: The gruppo oncologico nord ovest. *JCO* 2007; 25(13):1670-6
- 98) Normanno N, Tejpar S, Morgillo F et al. Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6:519-27.
- 99) Amado RG, Wolf M, Peeters M et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26:1626-34.

- 100) Adelstein BA, Dobbins TA, Harris CA et al. A systematic review and meta-analysis of KRAS status as the determinant of response to anti-EGFR antibodies and the impact of partner chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2011; 47:1343-54.
- 101) Vale CL, Tierney JF, Fisher D et al. Does anti-EGFR therapy improve outcome in advanced colorectal cancer? A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 2012; 38:618-25.
- 102) Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A et al. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Oncol* 2015; 26:13-21.
- 103) Tran B, Kopetz S, Tie J et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2011; 117:4623-32.
- 104) Tie J, Gibbs P, Lipton L 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.
- 105) Yokota T, Ura T, Shibata N et al. BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer. *Br J Cancer* 2011; 104:856-862.
- 106) Pietrantonio F, Cremolini C, Petrelli F. First-line anti-EGFR monoclonal antibodies in panRAS wild-type metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2015;96(1):156-66
- 107) Douillard J Y, Siena S, Cassidy J et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol.* 2010; 28(31):4697-705
- 108) Köhne C H, Hofheinz R, Mineur L et al. First-line panitumumab plus irinotecan/5-fluorouracil/leucovorin treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012; 138(1):65-72
- 109) Cassidy J, Clarke S, Diaz-Rubio et al. Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008; 26(12):2006-12.

- 110) Maughan TS, Adams RA, Smith CG et al. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet* 2011; 377:2103- 14.
- 111) Chen YX, Yang Q, Kuang JJ, et al. Efficacy of adding bevacizumab in the first-line chemotherapy of metastatic colorectal cancer: evidence from seven randomized clinical trials. *Gastroenterol Res Pract.* 2014; 2014:594930.
- 112) Cremolini C. et al. Updated results of TRIBES2, a phase III, randomized strategy study by GONO in the 1st- and 2nd-line treatment of unresectable mCRC. *Annals of Oncology* 2019. Volume 30, Issue Supplement 4.
- 113) Cunningham D, Lang I, Marcuello E 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* 2013; 14(11): 1077-85.
- 114) Mocellin S, Baretta Z, Roqué I Figuls M, et al. Second-line systemic therapy for metastatic colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;1(1):CD006875. Published 2017 Jan 27.
- 115) Bennouna J, Sastre J, Arnold D et al. Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer (ML18147): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013; 14(1):29-37.
- 116) Masi G, Salvatore L, Boni L et al. Continuation or reintroduction of bevacizumab beyond progression to first-line therapy in metastatic colorectal cancer: final results of the randomized BEBYP trial. *Ann Oncol* 2015; 26(4):724-30.
- 117) Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, 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. *J Clin Oncol.* 2012; 30(28):3499-506.
- 118) Price T J, Peeters M, Won Kim T et al. Panitumumab versus cetuximab in patients with chemotherapy-refractory wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer (ASPECCT): a randomised, multicentre, open-label, non-inferiority phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2014; 15(6):569-79.

- 119) Price T, Won Kim T, Li J et al. Final results and outcomes by prior bevacizumab exposure, skin toxicity, and hypomagnesaemia from ASPECCT: randomized phase 3 non-inferiority study of panitumumab versus cetuximab in chemorefractory wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2016; 68:51-59.
- 120) Peeters M, Price T J, Cervantes A et al. Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28(31):4706-13.
- 121) Kopetz S, Grothey A, Yaeger R et al. Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E-mutated colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2019; 381(17):1632-43
- 122) Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A et al Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicenter, randomized, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2013, 381(9863):303-12.
- 123) Mayer RJ, Van Cutsem E, Falcone A et al. Randomized trial of TAS-102 for refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2015; 372(20):1909-19.
- 124) Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, et al. Mismatch Repair Status and BRAF Mutation Status in Metastatic Colorectal Cancer Patients: A Pooled Analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS Studies. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(20):5322- 5330.
- 125) Yuza K, Nagahashi M, Watanabe S, Takabe K, Wakai T. Hypermethylation and microsatellite instability in gastrointestinal cancers. *Oncotarget*. 2017; 8(67):112103-115.
- 126) Heinemann K. Hereditary colorectal cancer: clinics, diagnostics and Management 2018; 75(10):601-06.
- 127) Lonsurf 20 Cpr Riv 15 mg 6 14 mg: Scheda Tecnica. Dr. Sandro Magnanelli, 10 Marzo 2020. (<https://www.torrimedica.it/schede-farmaci/lonsurf-20-cpr-riv-15-mg-6-14-mg/>)
- 128) Abrahao ABK, Ko YJ, Berry S and Chan K K W. A comparison of regorafenib and TAS-102 for metastatic colon cancer: a systematic review and network meta-analysis. *Clin Colorectal Cancer* 2018; 17(2):113-120.

- 129) Cremolini C, Rossini D, Martinelli E et al. Trifluridine/Tipiracil (TAS-102) in refractory metastatic colorectal cancer: a multicenter register in the frame of the italian compassionate use program. *Oncologist* 2018; 23:1178-87.
- 130) Xu J, Kim TW, Shen L et al. Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of trifluridine/tipiracil (TAS-102) monotherapy in asian patients with previously treated metastatic colorectal cancer: the TERRA study. *J Clin Oncol.* 2018; 36(4):350-358
- 131) Kwakman JJM, Vink G, Vestjens JH et al. Feasibility and effectiveness of trifluridine/tipiracil in metastatic colorectal cancer: real-life data from The Netherlands. *Int J Clin Oncol.* 2018; 23(3):482-489.
- 132) Samawi HH, Brezden-Masley C, Afzal AR, Cheung WY, Dolley A. Real-world use of trifluridine/tipiracil for patients with metastatic colorectal cancer in Canada. *Curr Oncol.* 2019; 26(5):319-329.
- 133) O'Brien WJ, Taylor JL. Therapeutic response of herpes simplex virus-induced corneal edema to trifluridine in combination with immunosuppressive agents. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991; 32(9):2455–61.
- 134) Blakley RL. The biosynthesis of thymidylic acid. IV. Further studies on thymidylate synthase, in *J. Biol. Chem.*, vol. 238, 1963, pp. 2113–18.
- 135) Matsuoka K, Nakagawa F, Kobunai T, Takechi T. Trifluridine/tipiracil overcomes the resistance of human gastric 5-fluorouracil-refractory cells with high thymidylate synthase expression. *Oncotarget.* 2018; 9(17):13438-50.
- 136) Nakanishi R, Kitao H, Kiniwa M et al. Monitoring trifluridine incorporation in the peripheral blood mononuclear cells of colorectal cancer patients under trifluridine/tipiracil medication. *Sci Rep.* 2017; 7(1):16969.
- 137) Matsuoka K, Iimori M, Niimi S et al. Trifluridine Induces p53-Dependent Sustained G2 Phase Arrest with Its Massive Misincorporation into DNA and Few DNA Strand Breaks. *Mol Cancer Ther.* 2015; 14(4):1004-13.
- 138) Moriwaki T, Fukuoka S, Masuishi T et al. Prognostic scores for evaluating the survival benefit of regorafenib or trifluridine/tipiracil in patients with metastatic colorectal cancer: an exploratory analysis of the REGOTAS study. *Int J Clin Oncol.* 2019; 25(4):614-21

- 139) Carriles C, Jimenez-Fonseca P, Sánchez-Cánovas M et al. Trifluridine/Tipiracil (TAS-102) for refractory metastatic colorectal cancer in clinical practice: a feasible alternative for patients with good performance status. *Clin Transl Oncol*. 2019; 21(12):1781-85.
- 140) Bijnsdorp IV, Kruijt FA, Fukushima M, Peters GJ. Trifluorothymidine induces cell death independently of p53. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008; 27(6):699-703.
- 141) Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993; 74:957-67.
- 142) Matsushashi N, Saio M, Matsuo A, Sugiyama Y, Saji S. p53 dependence and apoptosis in response to FP treatment with p53-transfected colon cancer cell lines by use of thin layer collagen gel. *Oncol Rep* 2004; 12:357-61.
- 143) Backus HH, Wouters D, Ferreira CG et al. Thymidilate synthase inhibition triggers apoptosis via caspases-8 and -9 in both wild-type and mutant p53 colon cancer cell lines. *Eur J Cancer* 2003; 39:1310-7.

Ringraziamenti

Ringrazio la Prof.ssa Rossana Berardi, Direttore della Clinica di Oncologia Medica, AOU Ospedali Riuniti di Ancona, che ha accettato con entusiasmo la mia richiesta di poter svolgere la tesi in ambito oncologico e mi ha accolta nel suo reparto aiutandomi con i suoi preziosi consigli.

Un ringraziamento speciale al Prof. Riccardo Giampieri che ha avuto un ruolo fondamentale e nonostante le difficoltà che si sono presentate quest'anno è riuscito comunque a guidarmi in questo progetto.

Ringrazio la mia famiglia ma sarebbe fin troppo scontato ringraziarli “solo” per il contributo economico. Sempre presenti sempre di sostegno e pronti ad alleggerire quella pesantezza che troppo spesso ho portato in casa. Li ringrazio per l'amore che mi hanno dato e per gli immancabili in bocca al lupo prima di ogni esame, ma so che comunque non li ringrazierò mai abbastanza. Spero sappiate che l'orgoglio che provate per me in questo momento non è minimamente equiparabile all'orgoglio che in ogni istante provo nell'essere vostra figlia, tua sorella.

Voglio ringraziare i tanti, troppi, che non hanno visto nemmeno l'inizio del mio percorso ma a cui ho rivolto il pensiero in ogni momento non solo di debolezza ma soprattutto di gioia che avrei desiderato condividere con loro. Vorrei avervi qui.

Ringrazio i miei zii, i miei cugini e la piccola Emilia per avermi donato ad ogni mio rientro quell'aria di “casa” di cui ognuno ha bisogno complici i pranzi insieme e le tante (troppe?) partite a carte.

Ringrazio le amiche e amici dell'università per tutte le ansie condivise, per le attese degli esami trascorse insieme e per le interminabili chiacchierate su tutto e su niente, ma soprattutto per la gioia quotidiana nel vedersi anche solo per un caffè. Senza di loro probabilmente dovrei ancora trovare il coraggio di sostenere metà degli esami.

Ringraziamento speciale va a Francesca, Eleonora, Veronica ed Alessandro per gli innumerevoli ricordi indelebili che mi hanno donato e per quel clima costante di festa che ha reso unico il mio percorso.

Una particolare menzione va a Lara e Chiara per l'immenso e impagabile sostegno morale che mi ha permesso di affrontare questi periodi bui di quarantena sempre con il sorriso.

Ringrazio Carlo ed Anna per tutte le volte in cui mi hanno fatto sentire libera, felice e (ancora?) giovane.

Ringrazio Cristina la mia migliore amica troppe volte lontana ma mai distante, la persona che più mi ha spronata a cominciare questo percorso facendomi sentire sempre all'altezza e speciale come solo lei sa e può fare d'altronde il nostro è un amore dopo una vita, cosa pensi che ti dica?

Ad Esse sempre forte al punto tale da sovrastare ogni mia incertezza. Ti ho trovato in ogni giorno e in ogni momento, non vorrei minimizzare tutto con un semplice grazie posso solo dire di non ritenerti la mia metà, ma il mio 'Uno' e questa vittoria è mia quanto tua.

Vorrei essere in grado di darti anche solo una minima parte di tutto ciò che mi hai donato.

Grazie di cuore a Tutti.