

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	
<b>2. IL CANCRO DEL COLON-RETTO</b>	
2.1 <i>Epidemiologia</i>	3
2.2 <i>Eziologia e fattori di rischio</i>	7
2.3 <i>Anatomia patologica</i>	17
2.4 <i>Clinica</i>	20
2.5 <i>Diagnosi</i>	25
2.6 <i>Stadiazione</i>	27
2.7 <i>Prevenzione</i>	33
2.8 <i>Prognosi</i>	38
2.9 <i>Terapia</i>	41
<b>3. BIOLOGIA MOLECOLARE</b>	53
<b>4. SCOPO DELLA TESI</b>	57
<b>5. MATERIALI E METODI</b>	58
5.1 <i>Pazienti</i>	58
5.2 <i>Tecniche</i>	61
<b>6. RISULTATI</b>	63
6.1 <i>Espressione del CEA</i>	63
<b>7. DISCUSSIONE</b>	68
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	75

## 1. INTRODUZIONE

L'inquadramento clinico-istopatologico dei pazienti affetti da neoplasia maligna costituisce uno strumento irrinunciabile per la previsione della gravità della malattia e per la pianificazione della terapia più adeguata. Tuttavia, l'attuale sistema di stadiazione sembra avere alcuni limiti: se da un lato, infatti, consente di stimare in modo attendibile la probabilità di controllo della neoplasia e l'aspettativa di vita del paziente, dall'altro non riesce a scorporare, nell'ambito di categorie omogenee per sede e per stadio, i casi che hanno differenti evoluzioni della malattia e risposta alla terapia.

Pertanto, la sfida che dobbiamo affrontare oggi è rappresentata dal tentativo di personalizzare l'inquadramento del paziente per indirizzarlo verso la terapia più efficace.

La resezione chirurgica con linfadenectomia *en-bloc* rappresenta a tutt'oggi il trattamento di scelta per la maggior parte delle neoplasie tra le quali quelle del colon. Proprio l'identificazione di metastasi linfonodali è il più importante fattore predittivo per la sopravvivenza a lungo termine per tale tipo di tumore, dato dimostrato dal fatto che la sopravvivenza a 5 anni si riduce da circa l'80 %, per i pazienti in stadio II, al 50 %, per i pazienti con metastasi linfonodali.

Proprio dalla valutazione del ruolo prominente svolto dalle micrometastasi linfonodali nella stratificazione prognostica dei pazienti affetti da cancro del colon, gli studi scientifici si sono rivolti verso la ricerca e l'analisi di cellule circolanti tumorali presenti a livello del sangue periferico. La caratterizzazione di tali cellule potrebbe, in tal modo, rappresentare un ulteriore fattore prognostico di notevole importanza per integrare le attuali metodiche stadiative, identificando i pazienti che più beneficerebbero di un trattamento adiuvante personalizzato.

## 2. IL CANCRO DEL COLON-RETTO

### 2.1 Epidemiologia

Il cancro del colon-retto rappresenta la neoplasia più frequente dell'apparato gastroenterico e si colloca al quarto posto per incidenza globale di neoplasie (terzo posto per il sesso maschile dopo polmone e prostata e secondo per il sesso femminile dopo la mammella).<sup>i</sup>

L'incidenza di questa neoplasia, soprattutto negli ultimi decenni, sta progressivamente aumentando, verosimilmente a causa di un progressivo invecchiamento della popolazione, dell'adozione di un regime di vita sedentario, di un'alimentazione ricca di grassi e dell'obesità.<sup>ii</sup> In particolare in Italia si osservano, annualmente, circa 40 nuovi casi ogni 100.000 abitanti.<sup>iii</sup>

In Europa l'incidenza è del 12,3% nel sesso maschile e del 13,8% nel sesso femminile, con una mortalità relativa rispettivamente pari all'11,9% e al 13,8%.<sup>iv</sup> I valori più alti di incidenza sono presenti nei Paesi più industrializzati, come Nord America, Nuova Zelanda, Giappone ed Europa Occidentale, superando di 4 volte i Paesi in via di sviluppo<sup>v</sup> (fig.2.1).

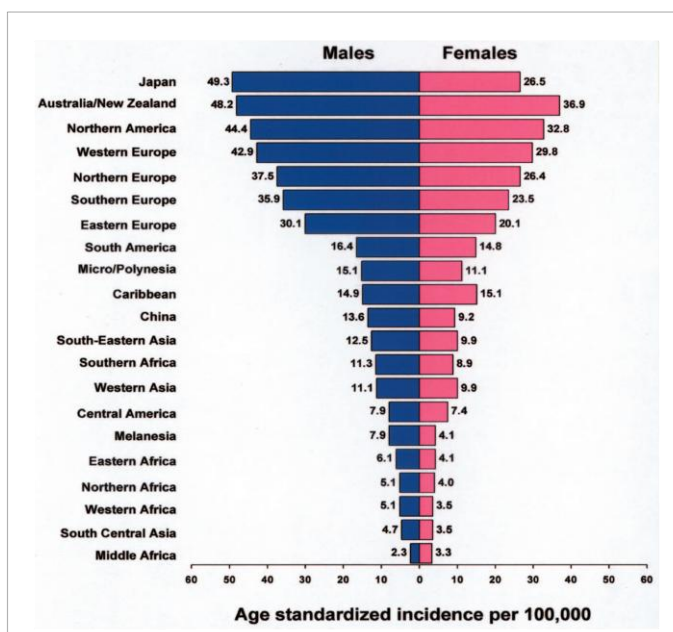


Figura 2.1 Distribuzione dell'incidenza del cancro del colon nel mondo in base al sesso ed all'età<sup>5</sup>.

In particolare i dati riportati dal Registro Tumori della Regione Toscana (RTRT), negli ultimi anni hanno mostrato un trend di incidenza in crescita per l'uomo ed in diminuzione per la donna. (Fig.2.2).

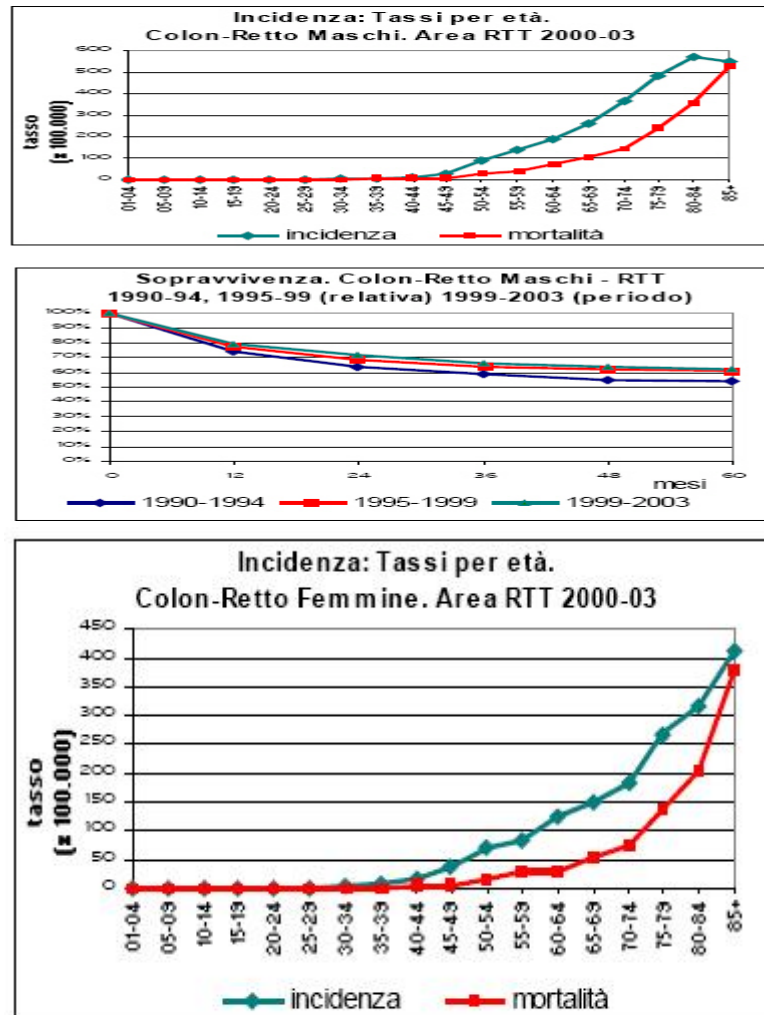


Fig. 2.2 Curve di incidenza e di mortalità del cancro del colon-retto nei maschi e nelle femmine secondo il Registro Tumori della Regione Toscana.

Il cancro del colon-retto colpisce generalmente individui di età avanzata, con un picco a livello della VI e VII decade.<sup>3</sup> Il rischio si manifesta a partire dai 40 anni e cresce esponenzialmente negli anni successivi (fig.2.3 e 2.4).

Incidenza su 100.000 persone

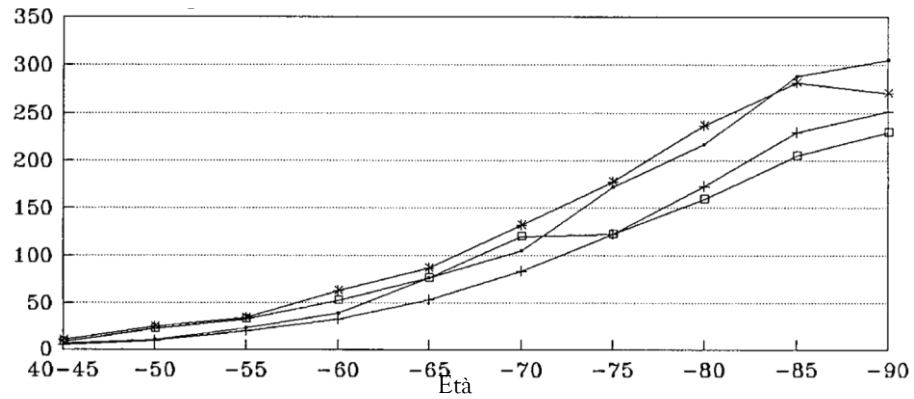


Fig.2.3 Incidenza del carcinoma del colon destro in America sulla base dell'età, razza e genere.

●: uomini bianchi, ×: uomini afro-americani, +: donne bianche, □: donne afro-americane<sup>vi</sup>.

Incidenza su 100.000 persone

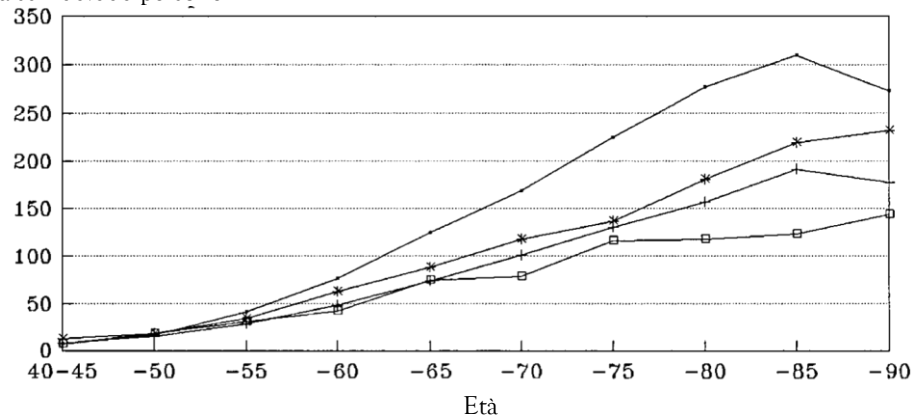


Fig.2.4 Incidenza del cancro del colon sinistro in America sulla base dell'età, razza e genere.

●: uomini bianchi, ×: uomini afro-americani, +: donne bianche, □: donne afro-americane<sup>6</sup>.

Gli studi di migrazione hanno dimostrato l'influenza dei fattori ambientali sull'incidenza del tumore, dal momento che gli emigranti perdono rapidamente il rischio associato al loro paese d'origine, acquisendo quello del paese adottivo.<sup>vii</sup>

E' inoltre di notevole importanza distinguere il tumore del colon da quello del

retto, dal momento che presentano un diverso comportamento dal punto di vista epidemiologico con un rapporto di frequenza tra loro di circa 2:1 nelle popolazioni ad alto rischio, mentre si mantiene alla parità nelle popolazioni a basso rischio.

Per quanto riguarda la mortalità, negli ultimi 20 anni circa si è assistito ad una progressiva diminuzione, con un parallelo miglioramento della sopravvivenza.<sup>4</sup>

Anche in Toscana abbiamo assistito ad una riduzione della mortalità per entrambi i sessi, con una sopravvivenza relativa a 5 anni che si aggira intorno al 60%, come è possibile osservare nella figura 2.5.

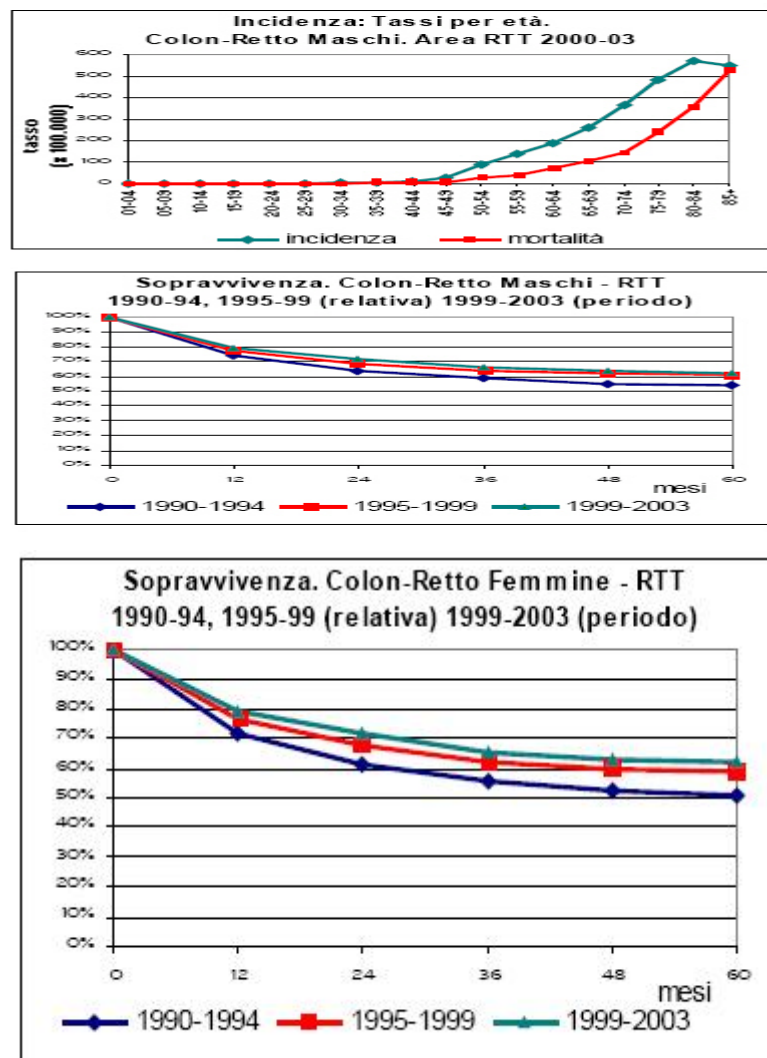


Fig. 2.5 Curve di sopravvivenza del cancro del colon-retto nei maschi e nelle femmine secondo il RTT.

Questo è probabilmente dovuto ad un miglioramento delle tecniche

diagnostiche, ad un maggior diffusione delle pratiche di screening<sup>viii</sup>, oltre che al progresso dei provvedimenti terapeutici, sia per le tecniche chirurgiche che per i trattamenti medici aiuvanti.<sup>ix</sup> In Europa i valori sono scesi per il sesso maschile da 20,1/100.000 nel quinquennio 1960-1964 a 19,2/100.000 negli anni 1995-1999, e per il sesso femminile da 14,0 a 12,1/100.000. Norvegia e Svizzera sono tra i Paesi europei che detengono i risultati migliori, mentre Repubblica Ceca e Danimarca (con 35,4 e 22,8/100.000 rispettivamente) registrano i più alti tassi di mortalità.<sup>x</sup>

Oltre a ciò, è stata registrata una variazione della sede di insorgenza del tumore, con un incremento delle localizzazioni nel colon ascendente rispetto alle porzioni più distali (soprattutto nei Paesi a più alto rischio).<sup>xi,xii</sup> Sigma e retto sono le sedi maggiormente interessate per le forme sporadiche, mentre il colon prossimale per le forme ereditarie.

## 2.2 *Eziologia e fattori di rischio*

### 2.2.1 *Fattori ambientali*

La notevole variabilità di incidenza riscontrata tra le varie aree geografiche e le etnie, gli studi di migrazione e la diversità negli indici epidemiologici tra le varie nazioni hanno fatto presupporre che, su di un pattern di suscettibilità genetica propria di ciascun individuo, nel determinismo del cancro del colon-retto siano in gioco altri fattori, definiti ambientali, e responsabili del processo di cancerogenesi.<sup>1</sup> Questi, tuttavia, condizionerebbero lo sviluppo del cancro in tempi diversi: il fumo di sigaretta e l'uso di alcuni farmaci (ruolo protettivo dei FANS) avrebbero un'influenza sui primi momenti della cancerogenesi<sup>xiii,xiv</sup>, favorendo lo sviluppo di adenomi, mentre l'obesità e la ridotta attività fisica sembrano esercitare il loro ruolo nelle fasi più tardive della progressione neoplastica.<sup>xv</sup> Tali considerazioni valgono principalmente per il tumore del colon-retto *sporadico*, poiché nelle forme familiari (5-10%), il principale

contribuito è svolto dalle mutazioni genetiche ereditarie, responsabili quindi dell'insorgenza del cancro.

I principali fattori ambientali sono:

- *Introito calorico*: il rischio di cancro del colon-retto è inversamente correlato all'introito energetico complessivo, indipendentemente dalla fonte alimentare (proteine, grassi o carboidrati).<sup>xvi</sup>
- *Attività fisica*: una scarsa attività fisica è considerata un fattore di rischio indipendente ed è stata riscontrata un'associazione, statisticamente significativa, con lo sviluppo di un cancro del colon (soprattutto del tratto prossimale); al contrario la probabilità di ammalarsi si riduce del 50% nei soggetti che svolgono una regolare attività sportiva.<sup>xvii</sup>
- *Obesità*: un elevato indice di massa corporea (BMI > 29) e la maggiore adiposità centrale tipica del sesso maschile sembra rappresentare un fattore di rischio per lo sviluppo di adenomi nel colon distale e nel retto. Nelle donne, invece, questa correlazione non sembra essere presente, così come non si è notata una significativa relazione tra BMI e comparsa di adenomi rettali.<sup>18</sup> L'obesità, così come l'inattività fisica ed il diabete di tipo 2, ha un ruolo importante peso nella genesi del cancro a causa dell'iperinsulinemia e, quindi, elevati livelli di *insuline-like grow factor 1* (IGF-1) (l'insulina induce una riduzione della proteina legante l'IGF-1, aumentando la sua forma libera e bioattiva) . Sia l'insulina che l'IGF-1, infatti, sono coinvolti nello sviluppo della neoplasia, nella progressione e nella metastatizzazione, attraverso l'induzione della crescita delle cellule e l'inibizione dell'apoptosi.<sup>xviii</sup>
- *Dieta*: il regime alimentare costituisce un parametro altamente variabile sia nell'ambito interindividuale che intraindividuale. Non è stato ancora ben stabilito quanto i cibi, i singoli nutrienti o la loro combinazione correlino in modo specifico con lo sviluppo del tumore.

In particolare, per quanto riguarda il *consumo di grassi*, si è notata una stretta correlazione tra il rischio di cancro del colon e i grassi di tipo



animale, ma non vegetale,<sup>10</sup> ipotizzando un loro ruolo nello stimolo della secrezione degli acidi biliari i quali, a loro volta, sarebbero convertiti in agenti cancerogeni o promotori del processo di cancerogenesi. Questo processo è stato identificato nella conversione dei fosfolipidi presenti nella bile in *diacilglicerolo*, da parte della flora batterica intestinale che si sviluppa con l'aumento dell'assunzione di grassi. Si suppone che il diacilglicerolo entri direttamente nelle cellule stimolando la proteinchinasi-C, coinvolta nei meccanismi di trasduzione intracellulari. Anche il *consumo di carne rossa* sarebbe associato ad un elevato rischio di sviluppo di cancro. Per il meccanismo alla base di tale effetto cancerogeno, vengono chiamate in causa le *amine aromatiche eterocicliche*, che si sviluppano dalla cottura della carne ad alte temperature e per lungo tempo.<sup>xix</sup> Inoltre è necessario considerare che il processo di detossificazione delle amine aromatiche è geneticamente predeterminato e, quindi, variabile da persona a persona.

Riguardo al ruolo svolto dalle *fibre*, non è ancora chiaro se la loro assunzione abbia un effetto protettivo o meno. I meccanismi attraverso i quali le fibre, in modo specifico quelle contenute in frutta e verdura, interferirebbero con lo sviluppo del cancro sono diversi: legame agli acidi biliari, inibizione della formazione di nitrosoamine, incremento del contenuto acquoso delle feci, diluizione dei cancerogeni, effetti antiossidanti, riduzione del tempo di transito intestinale. Inoltre, le fibre, agendo da substrato per la fermentazione della flora batterica, porterebbero alla formazione di catene corte di acidi grassi, tra i quali il butirrato che ha dimostrato avere un potere cancerogeno *in vitro*. Il loro ruolo è, tuttavia, controverso: mentre alcuni studi hanno riportato una relazione inversa tra il consumo di fibre e rischio di cancro del colon e del retto, sia per gli uomini che per le donne e nelle diverse fasce di età, altri studi condotti negli Stati Uniti non hanno evidenziato né alcun decremento del rischio, in funzione dell'assunzione di fibre, né alcuna

modificazione sull'incidenza di nuovi adenomi.<sup>xx</sup>

Al contrario, è stato evidenziato un ruolo protettivo da parte di *vitamine e sali minerali*. 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 di Calcio, infatti, fino ad un apporto giornaliero di 700-800 mg, conduce ad una riduzione del rischio di cancro del colon distale grazie ad una riduzione dell'attività proliferativa delle cellule della mucosa colica. Anche l'elevato consumo di acido folico è associato ad un decremento del rischio di cancro fino al 50%, grazie alla sua partecipazione nei processi di sintesi, riparazione e metilazione del DNA.<sup>xxi</sup>

- *Alcool*: forti consumatori di alcool presentano un più alto rischio di tumore sia del colon che del retto. Ciò è presumibilmente dovuto all'azione dell'*acetaldeide*, composto derivante dalla detossificazione dell'alcool che antagonizza il metabolismo del folato e della metionina.<sup>24</sup>
- *Fumo*: ha azione di iniziatore nella cancerogenesi a causa degli *idrocarburi policiclici aromatici*, i quali formano degli addotti col DNA delle cellule della mucosa intestinale. Esso può favorire la comparsa della malattia dopo un lungo periodo di induzione, tanto che il tempo intercorso tra l'inizio dell'esposizione al fumo e lo sviluppo del cancro è stimato tra le 3 e le 4 decadi.<sup>xxii</sup>
- *Irradiazione della regione pelvica*: l'effetto terapeutico delle radiazioni ionizzanti si basa su alterazioni chimiche a carico del materiale genetico delle cellule neoplastiche, tale da determinare un danno incompatibile con la sopravvivenza delle cellule. Per quanto riguarda le cellule sane, uno dei possibili effetti delle radiazioni ionizzanti non è solo l'induzione della loro morte, ma anche la creazione di mutazioni attivanti la proliferazione cellulare e determinanti, quindi, la trasformazione neoplastica.

### 2.2.2 Fattori genetici

La cancerogenesi è un processo multifasico in cui la presenza di alterazioni genetiche conduce alla trasformazione della mucosa colica normale in adenocarcinoma. Tale trasformazione richiede un lungo periodo di tempo (circa 15-20 anni) ed è caratterizzata da parallele modificazioni sul versante molecolare e istologico. I geni più frequentemente interessati possono essere: *geni oncosoppressori*, che modulano in senso negativo il processo di proliferazione cellulare; *proto-oncogeni*, codificanti per recettori di fattori di crescita, fattori di trascrizione nucleare e proteine intracellulari trasduttrici del segnale di crescita e geni del *mismatch repair*, coinvolti nella riparazione dei danni al DNA.

Nella maggior parte dei casi, le mutazioni genetiche presenti nel genoma della cellule tumorali sono somatiche (perciò acquisite), e non verranno tramandate alle future generazioni. In tal caso si parlerà di cancro *sporadico*. In circa il 6% dei pazienti, invece, le alterazioni genetiche sono ereditate, quindi presenti nella linea germinale e trasmesse in modo autosomico dominante. La loro frequenza globale è indicata in figura 2.6.

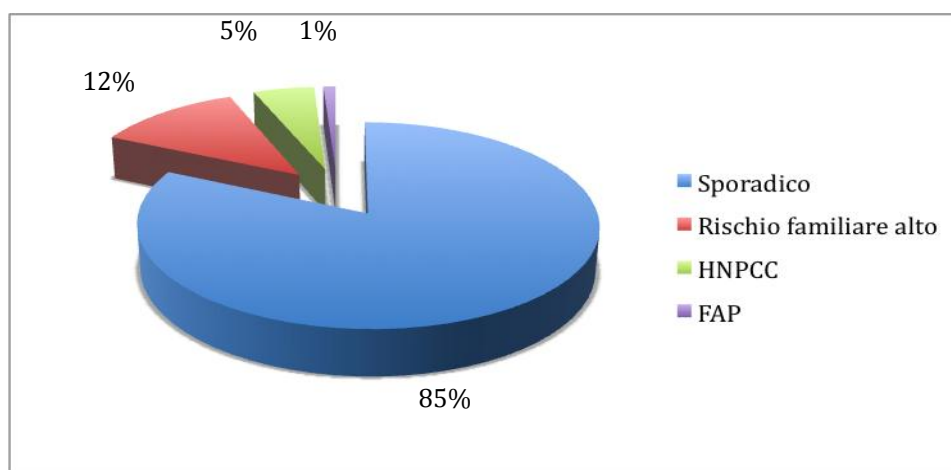


Fig.2.6 Frequenza globale del tipo di tumore del colon-retto<sup>23</sup>.

Le sindromi genetiche di cancro del colon-retto possono essere distinte in base alla presenza o all'assenza di poliposi, condizione patologica contraddistinta da un elevato numero di polipi in segmenti diversi del grosso intestino e talora in

tutto il tubo digerente. Tra le poliposi vanno ricordate la Poliposi Adenomatosa Familiare (*Familiar Adenomatous Polyposis*, FAP) e le sue varianti quali la sindrome di Gardner, la sindrome di Turcot e la sindrome di Zanca. Meritano, inoltre, attenzione, anche la sindrome di Peutz-Jeghers e la Poliposi Giovanile, che si caratterizzano per la presenza di polipi amartomatosi, e quindi istologicamente diversi rispetto a quelli della FAP. Tra le forme non associate a polipi troviamo, invece, la sindrome di Lynch o sindrome del carcinoma coloretale non associato a poliposi (*Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer*, HNPCC).<sup>xxiii</sup>

La FAP è stata la prima sindrome poliposica conosciuta e rimane ad oggi la più descritta. La sua incidenza è stimata essere approssimativamente 1/10.000 casi, con un'incidenza sovrapponibile tra uomini e donne. La trasmissione è autosomica dominante con una penetranza di quasi il 100%. Il gene responsabile è l'APC (adenomatous polyposis coli), un gene oncosoppressore localizzato sul braccio lungo del cromosoma 5, la cui mutazione si presenta, peraltro, anche in oltre un terzo dei casi del cancro sporadico. Da notare che, finché il soggetto possessore del gene mutato ereditato (germinale), non va incontro ad una seconda mutazione (somatica) che coinvolga l'altro allele, non ci sarà lo sviluppo della poliposi<sup>xxiv</sup>. Responsabile dell'1% circa dei tumori del colon-retto, la FAP si contraddistingue per l'insorgenza di almeno 100, ma spesso centinaia di polipi adenomatosi – solitamente tubulari e sessili – in epoca giovanile (seconda o terza decade di vita, con un'età media di insorgenza di 16 anni) lungo tutto il tratto gastroenterico, con una predilezione per il colon. Col tempo il loro numero e le loro dimensioni aumentano, fino a raggiungere le migliaia e, se non diagnosticati evolvono in carcinomi tra la terza e la quarta decade. Il rischio di trasformazione maligna è stimato del 60-80% ed è correlato al numero di polipi ed all'età del paziente. La FAP si manifesta clinicamente con diarrea e sanguinamento gastrointestinale, ma la maggior parte dei portatori della mutazione rimane asintomatica fino allo sviluppo del cancro. Senza diagnosi e quindi senza un adeguato trattamento, la morte per cancro si verifica

intorno ai 42 anni di età. Gli individui affetti, inoltre, hanno un elevato rischio di sviluppare neoplasie extracoliche, identificando così le varianti della FAP. Nella sindrome di Gardner si ritrovano associati tumori desmoidi, osteomi multipli e fibromi cutanei. La sindrome di Turcot si caratterizza per l'associazione di polipi multipli intestinali e tumori cerebrali, mentre la sindrome di Zanca presenta l'associazione di polipi multipli ad esostosi cartilaginee. Si suppone che tutte queste diverse manifestazioni fenotipiche dipendano da un'unica alterazione con espressività variabile.<sup>1</sup> A causa dell'elevato rischio di sviluppo di carcinoma sono necessari una diagnosi precoce ed uno screening nelle famiglie affette. Lo screening inizia alla pubertà con una sigmoidoscopia semestrale o annuale fino ai 35 anni, momento in cui la frequenza dell'esame è ridotto a triennale se non sono mai stati evidenziati polipi. Una volta diagnosticati i polipi, è necessario eseguire una colonscopia 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 stata fatta più tardivamente.<sup>xv</sup> Esistono anche dei protocolli di chemioprevenzione con anti-infiammatori non steroidei (FANS), come Sulindac ed inibitori selettivi della COX-2, che riducono il numero e le dimensioni dei polipi, senza però dare una protezione completa.

La sindrome del carcinoma ereditario del colon non associato a poliposi (HNPCC) o sindrome di Lynch, è la più comune forma di cancro del colon ereditario, responsabile di circa il 5% dei casi di carcinoma coloretale. Dal punto di vista genetico, anche questa sindrome ha un'ereditarietà autosomica dominante. Si associa ad una mutazione dei geni di mismatch repair *hMSH2*, sul braccio corto del cromosoma 2, oppure *hMLH1*, sul braccio corto del cromosoma 3. Da notare, inoltre, che circa il 90% dei tumori del colon-retto e

Disorder	Gene(s)	CRC Risk/penetrance	Age of onset	GI manifestations	Extraintestinal manifestations
<i>Nonpolyposis disorders</i>					
HNPCC	DNA mismatch repair genes: hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH6	~80%	Polyps 20–30 years CRC 30–40 years Endometrial cancer 30–40 years	Discrete, often multiple, adenomatous colorectal polyps; early onset and multiple colorectal cancers	Early onset endometrial, ovarian, transitional cell, stomach, small intestine, hepatobiliary cancers; multiple cancers in the same individual
Muir–Torre	hMSH2, hMLH1				As in HNPCC plus sebaceous gland and breast carcinomas
<i>Polyposis disorders</i>					
FAP	Tumor suppressor gene: APC	~100%	Polyps 10–20 years CRC 20–40 years	100–5000 adenomatous colorectal polyps; fundic gland polyps; ileal and jejunal polyps; duodenal/ ampullary adenomas/cancer	Papillary thyroid cancer; hepatoblastoma; adrenal hyperplasia/carcinoma
Gardner syndrome	APC	~100%	As in FAP	As in FAP	Desmoid tumors; soft-tissue tumors; osteomas; dental abnormalities; CHRPE; plus those tumors seen in FAP
Turcot syndrome	APC (70%); hMLH1, hPMS2 (30%)	~100%	As in FAP	As in FAP	Central nervous system tumors – medulloblastomas, astrocytomas, ependymomas
AAPC	APC (proximal or distal ends)	Very high but not 100%	Polyps 20–30 years CRC 30–50 years	< 100 polyps; flat polyps; proximal colon distribution; abundant upper gastrointestinal polyps	
<i>Hamartomatous disorders</i>					
Peutz-Jeghers	Tumor suppressor: LKB1	~40%	Polyps early childhood CRC 30–40 years	5–100's of hamartomatous polyps throughout GI tract; polyps demonstrate smooth muscle pseudo-invasion	Mucocutaneous pigmentation; cancer of the breast (bilateral), cervix, gonads, thyroid and pancreas;
Juvenile Polyposis	Tumor suppressors – SMAD4 and BMPR1A; PTEN	10–40%	Polyps 5–15 years CRC: 15–40 years	50–200 polyps throughout GI tract, colonic predominance; polyps have abundant lamina propria; intussusception/prolapse of polyps; anemia; bleeding; protein-losing enteropathy	Congenital abnormalities, including cardiac, craniofacial and bowel rotations Cowden syndrome
Cowden syndrome	Protein tyrosine phosphatase gene: PTEN	No increased risk		Hamartomatous polyps throughout the GI tract	Verrucous skin lesions on face and extremities; skin, breast and thyroid cancer; macrocephaly; Lhermitte–Duclos disease
Ruvalcaba–Myhre–Smith	Protein tyrosine phosphatase gene: PTEN			Hamartomatous polyps throughout the GI tract	Unusual facies, macrocephaly, developmental delay, penile pigmented papules; thyroiditis; skeletal abnormalities
Hereditary mixed polyposis		~30%	Polyps 20–40 years CRC 30–50 years	1–15 atypical juvenile polyps; a mix of adenomatous, hyperplastic and hamartomatous polyps	No extraintestinal manifestations

Fig.2.7 Sindromi ereditarie del cancro del colon-retto<sup>24</sup>.

l'80% degli adenomi presenti nell'HNPCC presentano un'instabilità dei microsatelliti.<sup>1</sup> Tale alterazione genetica, caratterizzata dall'accumulo di danneggiamenti in specifiche sequenze del DNA altamente ripetute, può così essere utilizzata per la diagnosi della sindrome stessa ed è strettamente legata al difettoso funzionamento dei geni del mismatch repair. Il rischio di comparsa del carcinoma è generalmente dell'80% in età intorno ai 44 anni; fino a questa, il

soggetto può rimanere completamente asintomatico. Nella variante di tipo I, la sede più colpita è il colon destro e le neoplasie tendono ad essere multiple, sincrone o metacrone. Nella variante di tipo II, invece, vi è una predisposizione per lo sviluppo anche di tumori extraintestinali come endometrio, ovaio, uretere, pelvi renale, stomaco e tratto epatobiliare.<sup>xxvi</sup> Ad oggi, i criteri per identificare un paziente con HNPCC sono esclusivamente clinici e si basano sui *criteri di Amsterdam*:

- tre pazienti affetti da neoplasia del colon, dei quali almeno un parente di primo grado degli altri due;
- neoplasie diagnosticate prima dei 50 anni;
- due o più generazioni affette;
- esclusione della FAP.

I membri di famiglie affette da tumori, coloretali o extracolici, in età giovanile devono porre il sospetto di sindrome di Lynch, e sottoposti a screening con colonscopia ogni anno o 2 tra i 20 e i 25 anni. Nelle donne tra i 25 e i 35 anni sono raccomandati controlli ginecologici annuali (ecografia transvaginale e citologia endometriale), dal momento che la localizzazione endometriale è la seconda per frequenza dopo il colon-retto.<sup>29</sup>

Esistono, infine, le sindromi poliposiche amartomatose, come la sindrome di Peutz-Jeghers e la Poliposi Giovanile. Queste sono ancora meno frequenti dei quadri patologici precedenti (incidenza stimata tra 1/10.000 e 1/100.000 nati) e sono contraddistinte dalla comparsa in età infantile (prima decade di vita) di multipli polipi amartomatosi che possono interessare tutto il tratto gastroenterico. Questi sono di per sé privi di potenziale maligno ma si sono rivelati essere una condizione predisponente per lo sviluppo del tumore del colon-retto, dal momento che spesso i polipi giovanili hanno al loro interno aree a carattere adenomatoso. I soggetti affetti dalla sindrome di Peutz-Jeghers e dalla Poliposi giovanile evolvono verso il cancro rispettivamente nel 50% e nel 20% degli affetti.

Storia familiare	Stima del rischio (%)
Assenza di familiarità per cancro del colon-retto	2
Familiarità di I grado (1 familiare)	6
Un parente di I grado e 2 di II grado affetti	8
Un familiare di I grado affetto con età<45 anni	10
2 familiari di I grado affetti	17
HNPCC	70
FAP	100

Tabella 2.1 Rischio di sviluppo del tumore del colon-retto in base alla storia familiare<sup>1</sup>.

### 2.2.3 Altri fattori

- *Malattie croniche infiammatorie intestinali:* con questo termine si comprendono una serie di affezioni ad eziologia, per lo più, ignota ma con un analogo corredo sintomatologico, tra le quali quelle di maggior interesse sono il morbo di Crohn e la rettocolite ulcerosa. Lo sviluppo di tumore coloretale rappresenta una complicanza più frequente nei soggetti affetti da retto colite ulcerosa che morbo di Crohn, ed aumenta proporzionalmente alla durata di malattia (oltre i 10 anni) ed alla sua estensione (pancolite).
- *Polipi adenomatosi:* sono vere e proprie lesioni pre-neoplastiche, anche se solo il 6% di questi evolve in cancro. Ciononostante la loro presenza deve porre un sospetto, poiché più del 95% dei tumori maligni del colon-retto si presenta morfologicamente come un polipo. Il rischio di degenerazione maligna è strettamente dipendente dai seguenti fattori: variante istologica (basso per i tubulari, medio per i tubulo-villosi, alto per i villosi), dimensioni (elevato per diametri superiori ai 2 cm) e numero (aumenta con l'aumentare del numero). Si calcola che il 5-10%



della popolazione ne sia affetto e possono insorgere a qualsiasi età, sebbene siano infrequenti al di sotto dei 20 anni. La loro distribuzione nel grosso intestino è sovrapponibile con quella del tumore, dal momento che nella maggior parte dei casi ne rappresentano i precursori. Dal punto di vista clinico, il polipo adenomatoso, in tutte le sue varianti, può rimanere a lungo asintomatico e costituire un reperto occasionale in corso di indagini diagnostiche come colonscopia o clisma opaco. L'esame endoscopico è l'unico che permette una migliore caratterizzazione di natura di una lesione vegetante, in quanto permette di eseguire una biopsia e quindi una diagnosi istologica; è, inoltre, possibile effettuare l'asportazione del polipo durante l'esame endoscopico. Nei casi di impossibilità di esecuzione di una polipectomia endoscopica, a causa delle dimensioni o della conformazione della lesione, è necessario ricorrere al trattamento chirurgico, al fine di prevenire la naturale trasformazione maligna dell'adenoma.<sup>28</sup>

➤ *Pregresse patologie neoplastiche*

## 2.3 Anatomia patologica

### 2.3.1 Aspetto macroscopico

Pur potendo il tumore del colon-retto assumere numerose conformazioni macroscopiche, si distinguono essenzialmente le forme:

- ◆ *vegetante* : si presenta come una neoformazione sessile che protrude nel lume intestinale, d'aspetto fungoide o "a cavolfiore", a superficie e margini irregolari;
- ◆ *ulcerata* : è caratterizzata da margini sollevati, irregolari, eversi e dal fondo spesso sanioso; può essere circolare od ovoidale, con il diametro maggiore generalmente orientato lungo l'asse trasversale del viscere;

- ◆ *infiltrante* : è costituita da un'ulcerazione centrale e da un diffuso ed esteso ispessimento della parete, che può, in buona parte, essere ricoperta da mucosa normale; rappresenta spesso l'evoluzione di una forma vegetante o ulcerata ed è di frequente riscontro nella retto-colite ulcerosa;
- ◆ *anulare-stenosante* : si estende per tutta la circonferenza intestinale e determina un restringimento del lume; ha superficie irregolare, con estesi processi necrotici e tendenza ulcerativa; la parete infiltrata è deformata e rigida.

### 2.3.2 Aspetto microscopico

Sulla base delle caratteristiche istologiche è possibile suddividere la neoplasia del colon-retto in quattro gruppi principali, secondo la classificazione WHO (Tab.2.2):

- *tumori epiteliali* : l'adenocarcinoma (istotipo maggiormente rappresentato in assoluto), l'adenocarcinoma mucinoso, l'adenocarcinoma con cellule ad anello con castone, il carcinoma squamoso, il carcinoma adenosquamoso ed il carcinoma indifferenziato;
- *tumori non epiteliali* : tra questi il più importante è il leiomiomasarcoma;
- *carcinoidi* : possono insorgere dalle cellule argentaffini (cellule neuroendocrine presenti nella mucosa di tutto il tratto gastroenterico secernenti ormoni polipeptidici), dalle cellule non argentaffini, compositi;
- *tumori del sistema emopoietico e linfoidi* ;
- *tumori non classificabili*.

**Classificazione anatomico-patologica  
dei tumori maligni del colon-retto  
(redatta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità)**

*Tumori epiteliali*

Adenocarcinoma

Adenocarcinoma mucinoso

Adenocarcinoma con cellule ad anello con castone

Carcinoma squamoso

Carcinoma adenosquamoso

Carcinoma indifferenziato

*Carcinoidi*

Argentaffine

Non argentaffine

Composito

*Tumori non epiteliali*

Leiomiomasarcoma

Altri

*Neoplasie del sistema ematopoietico e linfoidi*

*Neoplasie non classificabili*

Tabella 2.2 Classificazione anatomopatologica dei tumori maligni del colon-retto<sup>3</sup>.

### 2.3.3 Modalità di diffusione

Il cancro coloretale può diffondersi localmente o dare ripetizioni a distanza dalla sede di origine.

Per continuità può invadere i segmenti colici vicini lungo l'asse trasversale e longitudinale del viscere ed il tessuto adiposo pericolico, mentre per contiguità gli organi e le strutture adiacenti, oppure colonizzare il peritoneo tramite fenomeni di esfoliazione cellulare, determinando il quadro della carcinosi peritoneale.

Il coinvolgimento di strutture a distanza del tumore può avvenire, invece, per via linfatica o per via ematica. I linfonodi sono frequentemente interessati da

questo tipo di neoplasia, interessando in maniera progressiva e graduale, con distribuzione segmentaria, prevalentemente i linfonodi peri e paracolici e soltanto successivamente i linfonodi più distanti. L'entità del coinvolgimento linfonodale varia notevolmente: in letteratura sono riportate frequenze che variano dal 33% al 62%, in stretta relazione con l'estensione parietale del tumore. Il coinvolgimento linfonodale, infatti, è maggiormente frequente dopo il superamento della muscolare propria ed aumenta ancora dopo l'infiltrazione della sierosa. La via di diffusione ematica, invece, si verifica nel caso dell'infiltrazione dei piccoli vasi venosi della sottomucosa o dei tessuti pericolici, con successivamente l'interessamento del circolo portale. Le sedi maggiormente colpite dalla metastatizzazione a distanza sono, quindi, il fegato, i polmoni, le ossa e l'encefalo. E' stato osservato che al momento della diagnosi il 20-25% dei pazienti ha già in atto metastasi epatiche e/o polmonari. Nel caso delle neoplasie del retto extraperitoneale, può essere frequente il rilevamento di metastasi polmonari in assenza di interessamento epatico al contrario di quanto avvenga nel colon, dove questa evenienza è più rara. Ciò è dovuto al fatto che il retto possiede un duplice drenaggio venoso: vene emorroidarie superiori, che fanno capo al sistema portale attraverso la vena mesenterica inferiore, e vene emorroidarie medie e inferiori, tributarie del circolo sistemico attraverso la vena ipogastrica<sup>3</sup>.

#### *2.4 Clinica*

La sintomatologia del carcinoma del colon-retto è caratterizzata da sintomi aspecifici: ematochezia ed alterazioni dell'alvo, sia in senso stitico che diarroico. Inoltre la sintomatologia può variare al variare della sede della neoplasia. Questo va attribuito, da un lato alle peculiarità morfologiche della neoplasia nelle diverse localizzazioni, dall'altro alle caratteristiche anatomiche e funzionali del tratto interessato<sup>xxvii</sup>.

- Colon destro : a questo segmento appartengono : cieco, colon ascendente, flessura epatica e colon trasverso prossimale. Il lume si presenta piuttosto rilevante ed il contenuto luminale essenzialmente liquido. Le lesioni che si sviluppano a questo livello sono tipicamente vegetanti, spesso di grosse dimensioni e talora ulcerate, facilmente sanguinanti.

Il quadro clinico è contraddistinto da sintomi molto spesso vaghi ed aspecifici, tali da essere facilmente trascurati sia dal paziente che dal medico, e sono :

- anemia, secondaria alla cronica e costante perdita ematica della superficie neoplastica, con rara evidenza macroscopica del sangue nelle feci (meno del 20% dei casi). Pertanto la presenza non motivabile di anemia sideropenica in ogni adulto sopra i 50 anni obbliga ad un attento approfondimento per la ricerca della causa mediante esami endoscopici;
  - dolore, di tipo gravativo, non molto intenso, sub continuo, localizzato nei quadranti addominali di destra e, talora, all'epigastrio, accompagnandosi spesso ad una vaga sintomatologia dispeptica;
  - astenia e palpitazioni, riconducibili per lo più all'anemizzazione;
  - massa palpabile che situata naturalmente in fossa iliaca destra, è indice di neoplasia avanzata, infiltranti la parete addominale;
  - anoressia e dimagrimento.
- Colon sinistro : comprende : colon trasverso distale, flessura splenica, colon discendente e sigma. Il materiale che attraversa questo tratto è invece prevalentemente solido ed i tumori che insorgono in queste sedi sono, per lo più, anulari di tipo stenosante. Per tali motivi ed a causa del minor diametro di questo distretto viscerale, è più frequente l'insorgenza di un quadro clinico di tipo occlusivo.

La sintomatologia è caratterizzata da:

- modificazioni dell'alvo, spesso minime e progressive, caratterizzate da stipsi o diarrea, ma in genere un'alternanza tra l'una e l'altra;
  - presenza di sangue nelle feci, talora in modesta quantità ed, a volte, in misura copiosa, spesso in associazione ad emissione di abbondante muco;
  - dolore addominale, spesso di tipo intermittente, di intensità variabile, localizzato prevalentemente ai quadranti inferiori sinistri o diffuso a tutto l'addome. E' correlabile alle contrazioni vivaci del colon a monte di una stenosi, volte a far procedere il materiale gassoso e fecale.
- Retto : ha dimensioni cospicue, soprattutto nella porzione ampollare che costituisce la maggior parte del viscere, e funge da serbatoio per le feci solide. Le neoplasie a questo livello sono prevalentemente vegetanti ed ulcerate, facilmente sanguinanti.

Si distinguono in base alla localizzazione del tumore, manifestazioni cliniche diverse:

- a livello sovrapollare la sintomatologia si sovrappone a quella del colon sinistro;
- nelle neoplasie ampollari prevalgono invece :
  - ✓ tenesmo, spiacevole e persistente sensazione di incompleto svuotamento rettale, con senso di peso e corpo estraneo, talora accompagnati da dolore gravativo;
  - ✓ rettorragia, emissione di sangue rosso vivo anche in grande quantità, durante e dopo la defecazione o indipendentemente da essa, associata di norma a mucorrea;
- le forme sottoampollari, spesso a rapida evoluzione verso la

stenosi, si presentano con:

- ✓ dolore perineale e perianale, che si accentua nel corso della defecazione;
- ✓ evacuazione di feci nastriformi, miste a sangue e muco;
- ✓ tenesmo imponente.

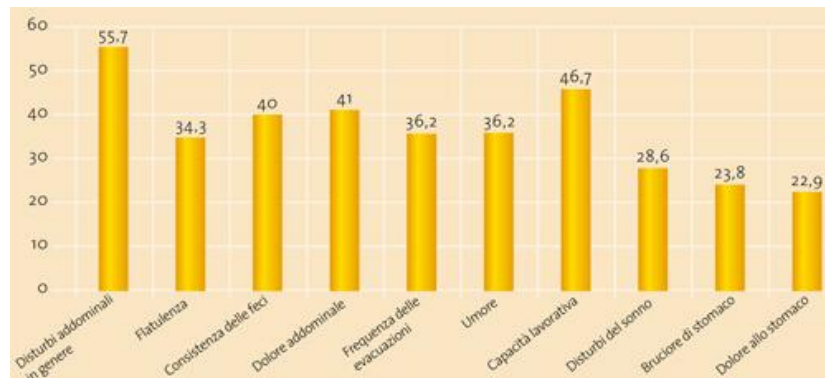


Fig.2.8 Principali segni e sintomi nelle diverse localizzazioni del cancro del colon-retto<sup>3</sup>.

A volte, però, il tumore può esordire immediatamente con i sintomi di una sua complicanza, quali:

- ileo meccanico, prevalentemente nel caso delle localizzazioni sinistre. I principali elementi clinici sono: distensione addominale, aumento della peristalsi caratterizzata da un timbro metallico, dolore intermittente di tipo colico, vomito, alvo chiuso a feci ed a gas;
- perforazione, si riscontra più frequentemente a livello del colon destro, in particolare del cieco. Può insorgere per fenomeni necrotici a livello della neoplasia o, più frequentemente, per la sovradistensione e successiva fissurazione della parete del cieco in caso di neoplasie del colon sinistro stenosanti, in presenza di una valvola ileociecale continente (rottura diastatica del cieco). Le sue manifestazioni sono relative alla conseguente peritonite, localizzata o diffusa : dolore addominale spontaneo ed alla palpazione, contrattura di difesa, ileo

paralitico, distensione, rigidità, ipomobilità respiratoria dell'addome, tachicardia, febbre, sudorazione.

- Emorragia, si presenta raramente per le lesioni del colon mentre è più frequente nel cancro del retto.

Da uno studio condotto tra il 2003 e il 2005 su un gruppo di 1966 pazienti con diagnosi di tumore del colon-retto, è stato notato che in più della metà dei casi la lesione dà iniziale manifestazione di sé con un solo sintomo (63%), e meno frequentemente con due (29%) o tre (7%). Per quanto riguarda la sede colica, i sintomi iniziali sono vaghi e mal definiti, come il dolore addominale e le modificazione dell'alvo, associandosi quindi ad un ritardo diagnostico per un'errata attribuzione del quadro ad un'altra patologia, sia dal paziente che dal medico (soprattutto nel sesso femminile a causa di un'attribuzione del quadro a patologie di origine ginecologica)<sup>xxviii</sup>.

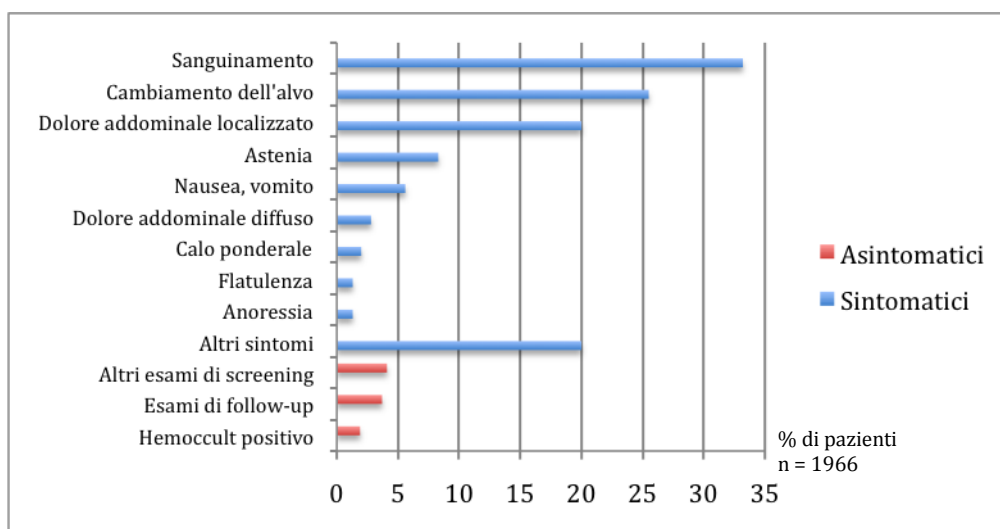


Fig.2.9 Modalità di presentazione del tumore del colon-retto in una casistica di 1966 pazienti in Australia nel 2007<sup>28</sup>.

I pazienti affetti da cancro del retto, invece, riferiscono in fase precoce il sanguinamento rettale, che si correla non solo ad un minor rischio di neoplasia in stadio avanzato, ma anche ad una più rapida consultazione del medico dopo la sua comparsa.<sup>xxix</sup> Questo sintomo, quindi, presenta un valore diagnostico maggiore di altre manifestazioni cliniche, meno specifiche come il dolore addominale, e presenta, inoltre, un valore predittivo specialmente se in



associazione ad un'alterazione dell'alvo e non accompagnato da sintomi perianali.<sup>xxx</sup>

### *2.5 Diagnosi*

L'approccio diagnostico al cancro del colon-retto è inizialmente clinico-anamnestico, basato sulla ricerca dei segni e dei sintomi clinici indicativi. Come si è detto, il sospetto è posto principalmente dalla comparsa di un sanguinamento rettale e/o dal cambiamento dell'alvo in un soggetto di età avanzata con fattori di rischio<sup>xxxi</sup>. Anche nei casi in cui il paziente presenti come quadro d'esordio la complicanza perforativa od occlusiva, è necessario indagare la causa considerando che il tumore colo rettale rappresenta un terzo delle cause di occlusione dell'intestino crasso ed è una delle cause più comuni di peritonite secondaria da perforazione di viscere cavo.

L'esame obiettivo aiuterà successivamente a fare una prima valutazione della sede attraverso l'esplorazione rettale, indagine semplice ma fondamentale, dal momento che questo distretto risulta essere una localizzazione tra le più frequenti delle neoplasie del grosso intestino. Presenta un'accuratezza del 44-83% in base all'esperienza del clinico ma, soprattutto, al fatto che clinicamente non è possibile distinguere tra forma infiammatoria e forma tumorale. E' comunque di notevole importanza non soffermarsi a questo livello nelle indagini diagnostiche, esaminando tutto il tratto colico.

Per quanto riguarda gli esami strumentali, lo studio endoscopico è essenziale e rappresenta il gold standard per la diagnosi, tanto da poter costituire la prima tappa degli accertamenti diagnostici. La retto-colonscopia infatti permette oltre che di esplorare tutti i segmenti del colon, di effettuare prelievi biotici di una lesione sospetta e quindi caratterizzarla dal punto di vista istologico. Oltre a ciò tale esame presenta anche un possibile ruolo preventivo, consentendo di asportare definitivamente le lesioni precancerose (polipi adenomatosi). Indagine

complementare ma talora alternativa alla colonscopia è rappresentata dal clisma a doppio contrasto (introduzione di mezzo di contrasto bariato e aria nel lume coloretale sotto controllo radioscopico), che permette un'accurata analisi della morfologia della parete retto colica ed evidenzia la presenza di alterazioni anche di piccole dimensioni (fino ad un centimetro di diametro)<sup>xxxii</sup>. Il segno radiologico di maggior rilievo è un difetto di riempimento di dimensioni variabili in rapporto alla forma ed alla sede della neoplasia. Questa metodica, così come anche la più recente colonscopia virtuale, è utile soprattutto in presenza di lesioni stenosanti e non oltrepassabili endoscopicamente che non permettono quindi una valutazione preoperatoria completa del colon. Questo è peraltro estremamente importante per il rischio di riscontrare lesioni tumorali sincrone in altri distretti colici, condizione che si verifica nel 5-10% dei casi.

Altre indagini diagnostiche strumentali, come la Tomografia Computerizzata (TC) dell'addome e l'ecoendoscopia, sono maggiormente utilizzate ai fini stadiativi del cancro, in quanto documentano eventuali disseminazioni a distanza ed in particolare a livello epatico, mentre rivestono un ruolo limitato ai fini diagnostici<sup>3</sup>.

Anche gli esami di laboratorio possono fornire in ausilio nella diagnosi attraverso il dosaggio su campioni di sangue dei cosiddetti marcatori tumorali, quali il CEA (antigene carcinoembrionario), l'antigene tumorale gastrointestinale CA 19.9 e il CA 125, generalmente presenti a bassi livelli nei campioni prelevati da soggetti sani. Il rialzo di questi marcatori al di sopra di livelli di riferimento (definiti livelli soglia) può essere spia della presenza di malattia neoplastica. Sfortunatamente il valore di queste sostanze è spesso influenzato da fattori diversi quali terapie farmacologiche (es. alcuni farmaci anti-ipertensivi) e/o dalla presenza di malattie non necessariamente tumorali (es. malattie infiammatorie croniche del colon, calcoli della colecisti) o, come spesso accade per il CEA, dall'abitudine al fumo. Il riscontro di un innalzamento dei livelli di questi marcatori, di elevata sensibilità ma di bassa specificità, non è quindi sufficiente da solo a porre diagnosi, bensì presenta un

ruolo sia a livello prognostico che nel follow-up post-chirurgico, rappresentando la spia di un'eventuale ripresa di malattia tumorale asintomatica<sup>xxxiii</sup>.

## 2.6 Stadiazione

### 2.6.1 Stadiazione preoperatoria

Per quanto riguarda la stadiazione preoperatoria i principali esami da eseguire sono:

- *ecografia dell'addome* : rappresenta un esame non soltanto di semplice e rapida esecuzione, ma di notevole importanza per la ricerca di eventuali secondarietà epatiche. Può essere effettuata anche intraoperatoriamente per meglio caratterizzare lesioni nodulari epatiche di dubbia natura, per la cui definizione diagnostica questa metodica è la più sensibile.
- *Radiografia del torace* : come per l'ecografia è eseguito da tutti i pazienti ed è fondamentale per la valutazione della presenza di secondarietà polmonari;
- *TC* : particolarmente utile nell'identificazione del grado di estensione parietale delle lesioni e dell'eventuale infiltrazione di organi contigui. Ha un'accuratezza molto elevata (77-100%), prevalentemente negli stadi più avanzati di malattia: 81% negli stadi C e D, mentre solo 17% negli stadi B. Utile per la valutazione e caratterizzazione di eventuali metastasi a distanza. Con le apparecchiature più moderne è anche possibile eseguire una *colonscopia virtuale*, particolarmente utile per completare lo studio del colon nei casi in cui l'esame endoscopico non sia stato completo a causa della presenza di lesioni stenosanti.
- *RMN* : risulta ancora più accurata della TC, per quanto riguarda la valutazione del grado di infiltrazione parietale nei cancri del retto extraperitoneali, anche se meno sensibile dell'ecoendoscopia e per

completare la definizione diagnostica delle lesioni nodulari epatiche.

- *ecoendoscopia* : è una metodica in uso dagli inizi degli anni '80 per la valutazione delle neoplasie del retto, con un'accuratezza del 67-93% sul tumore (T) e del 62-83% sui linfonodi (N). Il suo limite è rappresentato dalla difficoltà di evidenziare tumori microscopici e dalla presenza di stenosi e dal fatto di essere una tecnica operatore-dipendente<sup>1</sup>.
- *PET* : ha una maggiore sensibilità della TC e della RMN, ma dato che fornisce informazioni funzionali più che morfologiche, non precisando esattamente sede e dimensione della lesione neoplastica, è più indicata per monitorare la risposta alla terapia adiuvante più che nella stadiazione preoperatoria. Gli svantaggi di tale metodica sono i costi elevati e i falsi positivi, dovuti soprattutto alla presenza di fenomeni infiammatori che possono mascherare la neoplasia. Possiede comunque un ruolo di notevole importanza nella ricerca di metastasi sia linfonodali che a distanza.

### 2.6.2 Stadiazione post-operatoria

I sistemi di staging clinico e patologico delle neoplasie del grosso intestino hanno subito una continua revisione nel corso dei decenni, allo scopo di poter disporre di strumenti classificatori ad elevato potere prognostico, applicabili alle molteplici situazioni e definire la migliore strategia terapeutica per ogni tipo di paziente. Già nel 1932 Dukes descrisse una classificazione anatomopatologica estremamente semplice relativamente ai carcinomi del retto, allargata poi a tutto il colon, ancora oggi diffusamente utilizzata (sia negli Stati Uniti che in Europa), nonostante le numerose modifiche introdotte nel corso degli anni. Questo sistema classificativo prevede tre stadi: A, B e C, come è possibile osservare nella tabella 2.3. L'importanza di questa sistema stadiativo sta nel fatto che, oltre ad essere estremamente semplice, essenziale e riproducibile, ad ogni singolo stadio

si associa una diversa sopravvivenza a distanza.

<b>Classificazione di Dukes (1932)</b>
<b>A</b> = Tumore confinato entro la parete intestinale
<b>B</b> = Tumore che si estende oltre la parete intestinale
<b>C</b> = Qualsiasi tumore con metastasi linfonodali

**Tab.2.3** *Classificazione del tumore del colon-retto secondo Dukes<sup>3</sup>.*

Nel 1954 Astler e Coller hanno modificato gli stadi B e C suddividendoli in due gruppi ciascuno: B1 e B2, C1 e C2, come si nota dalla tabella 2.4.

Più recentemente, Turnbull nel 1967 ha aggiunto la categoria D per indicare la presenza di metastasi a distanza<sup>1</sup>.

<b>Classificazione di Astler-Coller – Dukes modificata (1954)</b>
<b>A</b> = Tumore limitato alla mucosa e sottomucosa
<b>B1</b> = Tumore non esteso oltre la muscolare propria
<b>B2</b> = Tumore che si estende oltre la muscolare propria
<b>C1</b> = Tumore non esteso oltre la muscolare propria con metastasi linfonodali
<b>C2</b> = Tumore esteso oltre la muscolare propria con metastasi linfonodali
<b>D</b> = Presenza di metastasi a distanza

**Tab.2.4** *Classificazione del tumore del colon-retto secondo Astler-Coller<sup>3</sup>.*

Un ulteriore sistema stadiativo è quello introdotto nel 1978 dall'*American Joint Committee for Cancer (AJCC)*, ovvero il sistema TNM, valido sia per il tumore colico che rettale. Questo stabilisce lo stadio della neoplasia sulla base dell'estensione del tumore primitivo (T), della presenza dell'interessamento linfonodale (N) e delle metastasi a distanza (M), come descritto in tabella 2.5.

## Classificazione dell'American Joint Committee-TNM (2004)

### Tumore primitivo (T)

- **Tx** = Tumore primitivo non definibile
- **T0** = Non evidenza di tumore primitivo
- **Tis** = Carcinoma *in situ*: intraepiteliale o invasione della lamina propria
- **T1** = Tumore limitato a mucosa e sottomucosa
- **T2** = Tumore non esteso oltre la muscolare propria
- **T3** = Tumore che si estende oltre la muscolare propria :
  - *pT3a* = minima invasione (<1mm oltre la muscolare propria)
  - *pT3b* = invasione (>5 mm oltre la muscolare propria)
  - *pT3c* = invasione moderata (da 5 a 15 mm oltre la muscolare propria)
  - *pT3d* = invasione estesa (>15 mm oltre la muscolare propria)
- **T4** = Tumore che infiltra il peritoneo viscerale o strutture od organi adiacenti

### Linfonodi regionali<sup>§</sup> (N)

- **Nx** = Linfonodi non definibili
- **N0** = Assenza di metastasi linfonodali
- **N1** = Presenza di 1-3 metastasi linfonodali
- **N2** = Presenza di 4 o più metastasi linfonodali

### Metastasi a distanza (M)

- **Mx** = Metastasi non definibili
- **M0** = Assenza metastasi a distanza
- **M1** = Presenza di metastasi a distanza

### Estensione della resezione chirurgica (R)<sup>†</sup>

- **Rx** = Presenza di tumore residuo non definibile
- **R0** = Assenza di tumore residuo
- **R1** = Presenza di tumore residuo microscopico
- **R2** = Presenza di tumore residuo macroscopico

<sup>§</sup>I linfonodi regionali sono: linfonodi pericolici e perirettali; linfonodi lungo il decorso delle arterie ileo-colica, colica destra, colica media, colica sinistra, mesenterica inferiore, emorroidaria superiore e iliaca interna.

<sup>†</sup>Si considerano non R0 i casi in cui: è stata eseguita una resezione non en-bloc, sono presenti margini positivi di malattia, malattia residua in sede linfonodale, Nx.

Tab.2.5 Classificazione TNM del tumore del colon-retto<sup>27</sup>.

Si riconoscono inoltre tre diversi livelli classificativi:

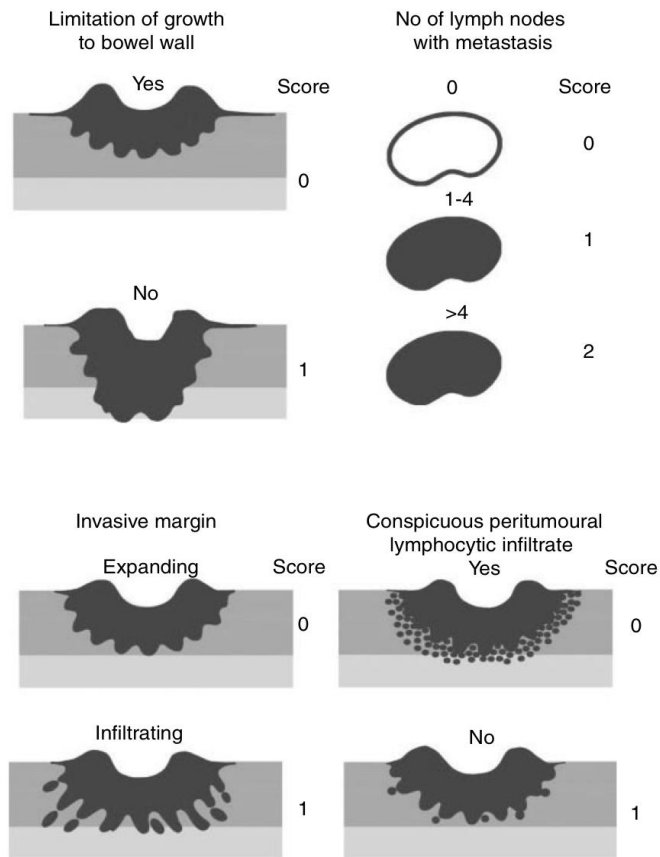
- c-TNM: valutazione clinico-diagnostica;
- s-TNM: valutazione chirurgica;
- p-TNM: valutazione post-chirurgica, anatomopatologica.

Tuttavia le prime due tipologie di classificazione si sono rivelate inadeguate riguardo al loro valore prognostico, quindi l'attenzione è maggiormente rivolta verso la stadiazione anatomopatologica p-TNM, a cui ci si riferisce quando è indicato il TNM del tumore in esame. Sulla base di questa, in relazione alla sopravvivenza a 5 anni sono stati poi stabiliti 4 stadi clinici (tabella 2.6).

<i>Astler e Coller</i>		<i>TNM</i>		<i>Stadio</i>
A	Tis	N0	M0	0
	T1	N0	M0	I
B1	T2	N0	M0	I
B2	T3	N0	M0	IIA
	T4	N0	M0	IIB
C1	T1-2	N1	M0	IIIA
	T3-4	N1	M0	IIIB
C2	Ogni T	N2,N3	M0	IIIC
D	Ogni T	Ogni N	M1	IV

Tab.2.6 Confronto tra le stadiazioni di Aster-Coller, TNM e gli stadi numerici<sup>1</sup>.

Negli anni '80 Jass ed i suoi collaboratori hanno sviluppato una modalità di assegnazione di uno score dipendente da quattro variabili istologiche: profondità di invasione del tumore, il pattern di crescita tumorale, l'infiltrazione linfocitaria peritumorale, il coinvolgimento linfonodale. A ciascuno viene attribuito arbitrariamente un punteggio dal patologo (fig.2.10) e dalla somma dei punti si ricava la suddivisione in 4 stadi (tabella 2.7)<sup>xxxiv</sup>.



*Fig.2.10* Parametri e modalità di assegnazione del punteggio nella classificazione Jass.<sup>35</sup>

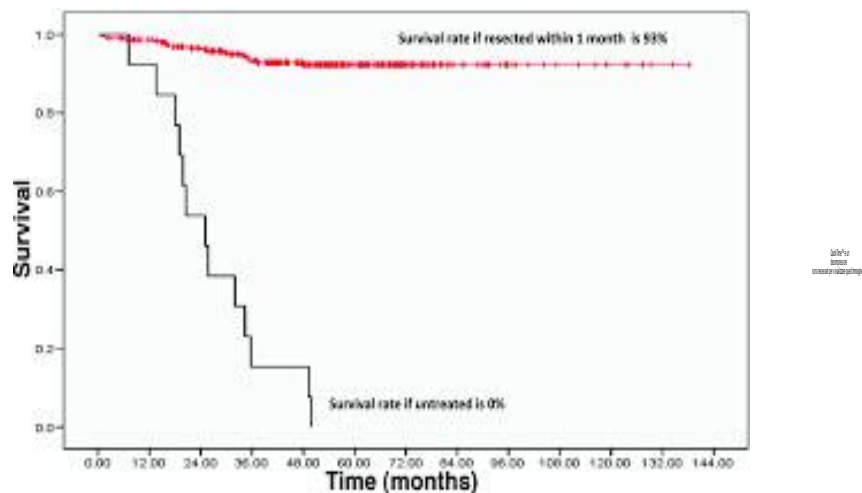
Stadi di Jass	Score
I	0-1
II	2
III	3
IV	4-5

*Tab.2.7* Suddivisione degli stadi di Jass sulla base del punteggio<sup>35</sup>.

Questo sistema stadiativo è stato recentemente utilizzato in associazione a quello di Dukes con lo scopo di fornire maggiori informazioni prognostiche, prevalentemente per gli stadi di incerto andamento clinico come lo stadio B di Dukes<sup>xxxv</sup>. In uno studio di Mander del 2006<sup>34</sup>, è stato osservato come lo stadio III di Jass possieda un maggior rischio di recidiva ed una più elevata mortalità



rispetto ai primi due (sopravvivenza a 5 anni Jass III 82% vs 65% Jass I e II). Inoltre, tutti i casi di Dukes in stadio B - Jass III presentano una significativa riduzione della sopravvivenza globale e dell'intervallo libero di malattia, non distante da quella dei soggetti inclusi nello stadio C di Dukes. In tal modo, all'interno dello stadio Dukes B sembra possibile identificare sottogruppi a peggior prognosi e selezionare coloro che dovranno essere sottoposti alla terapia adiuvante. Tuttavia, in questa stadiazione, la soggettività dell'operatore nella valutazione del margine di invasione o il numero di linfonodi positivi rappresenta il limite maggiore ed il motivo principale del fatto che, ancora, non si sia diffusa nella pratica clinica.



Mesi

**Fig.2.11** Sopravvivenza globale del cancro del colon-retto nello stadio B di Dukes sulla base della classificazione Jass. — Jass II; - - - Jass III<sup>35</sup>.

## 2.7 Prevenzione

A causa del notevole aumento dei casi di malattia neoplastica, negli ultimi anni è stata posta una grande attenzione nella prevenzione di questa, tanto da stabilire dei programmi di esami specifici verso i soggetti a rischio (mammografia, pap-test...).

Nel caso del tumore del colon-retto, alla diagnosi già il 20% dei pazienti

presenta metastasi in sede epatica, pertanto la scoperta della malattia in epoca precoce rappresenta l'obiettivo fondamentale della pratica clinica.

Tutti quei provvedimenti che hanno l'obiettivo di ridurre l'esposizione ai fattori eziologici o la suscettibilità dell'ospite agli stessi rappresentano la prevenzione *primaria*. Questa mira ad impedire il processo di iniziazione (insorgenza del danno genetico) e ad opporsi alla sua progressione che condurrebbe alla formazione del tumore. La limitazione degli interventi di prevenzione primaria risiede nella difficoltà di modificare le abitudini di vita, principalmente alimentazione ed esercizio fisico. Recentemente è stata proposta anche la *chemioprevenzione* come metodica preventiva primaria, ossia l'impiego di sostanze naturali o di sintesi che, in studi in vitro o in modelli animali, si sono dimostrate prive di tossicità e capaci di prevenire i processi di iniziazione, promozione e progressione del cancro, prima o durante la fase preneoplastica. Si distinguono tre tipi di chemioprevenzione: quella *primaria*, diretta verso la popolazione generale o a fasce di popolazione a rischio, che rappresenta un intervento di sanità pubblica e ha lo scopo di inibire l'insorgenza di neoplasia. La chemioprevenzione *secondaria* si attua nei casi in cui il tumore sia già presente ed ha lo scopo di bloccare la progressione ed indurre possibilmente la regressione delle lesioni, o impedire le recidive. La *terziaria*, invece, si realizza in concomitanza della chemioterapia e mira a ridurre gli effetti tossici ed aumentarne l'efficacia.<sup>1</sup>

Tra le sostanze di sintesi è stato notato un possibile ruolo chemiopreventivo dei farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) in coloro che ne facevano uso da lungo tempo, riportando una riduzione di incidenza e mortalità dei tumori maligni gastroenterici del 40-50%.<sup>xxxvi</sup> Sembrano diminuire anche la probabilità d'insorgenza di nuovi adenomi dopo trattamento per un pregresso carcinoma del colon. La loro efficacia è presente sia quando somministrati in una fase estremamente precoce della malattia (mucosa colica integra), sia quando somministrati in una fase più tardiva (presenza di adenomi), indipendentemente da età, sesso e segmento colico interessato. Tuttavia,

l'effetto protettivo è strettamente legato ad una continua e lunga assunzione, tanto che terminerebbe in concomitanza con la sospensione del farmaco. Particolare interesse è stato rivolto agli inibitori selettivi della COX-2 (come celecoxib e rofecoxib), enzima inducibile responsabile della sintesi di prostaglandine, trombossani e leucotrieni dall'acido arachidonico, la cui attività è incrementata sia nelle patologie infiammatorie che neoplastiche. Nei carcinomi del colon è stata infatti dimostrata una maggiore espressione della COX-2 e dei suoi prodotti rispetto ai tessuti sani (da ricordare che la PGE<sub>2</sub>, oltre che indurre la proliferazione cellulare, inibisce la morte delle cellule maligne ed è responsabile del mantenimento dello stato differenziato delle cellule). In studi condotti in animali di laboratorio portatori del difetto nel gene APC, il trattamento con un inibitore selettivo della COX-2 si è dimostrato capace di ridurre l'insorgenza della maggior parte degli adenomi.

Anche la terapia ormonale sostitutiva di lunga durata (5-10 anni) nelle donne in post-menopausa sembra ridurre il rischio di cancro coloretale del 30-40%, probabilmente per una riduzione della sintesi di IGF-1, ben noto fattore di crescita cellulare<sup>19</sup>.

Per prevenzione *secondaria* si intendono tutte quelle metodiche atte ad identificare la malattia in fase precoce, non ancora clinicamente manifesta. Per l'alta incidenza mondiale del carcinoma del colon-retto ed in considerazione del fatto che il riconoscimento della lesione tumorale nei primi stadi consente una sopravvivenza a 5 anni di circa il 90% e che non vi sono ancora dati certi sul ruolo della chemioprevenzione, allo stato attuale l'unico provvedimento per ridurre la mortalità da malattia è la diagnosi precoce. L'importanza dello screening è anche da correlare al fatto che il processo che conduce alla trasformazione dell'adenoma al carcinoma ha una durata di circa 10 anni, periodo in cui è possibile diagnosticare nel soggetto asintomatico la lesione in fase precoce ed eliminarla, prevenendo la morte del paziente.

Sulla popolazione generale la prevenzione secondaria è attuata attraverso lo *screening*, insieme di esami applicati in tempi diversi e selezionati nell'ambito dei

vari gruppi di rischio. I mezzi di screening di cui disponiamo oggi sono: ricerca di sangue occulto nelle feci (Hemoccult), sigmoidoscopia con strumento flessibile, colonscopia e clisma a doppio contrasto<sup>xxxvii</sup>. Sono inoltre in fase di sperimentazione altri test, come la ricerca nelle feci di DNA alterato appartenente alle cellule della mucosa coloretale e la colonscopia virtuale. Le opzioni sono molteplici a causa del fatto che nessun test abbia manifestato una superiorità inequivocabile se eseguito singolarmente<sup>xxxviii</sup>, anche se quella più diffusa è la ricerca del sangue occulto fecale, seguita da colonscopia in caso di test positivo. Grazie comunque all'applicazione di queste metodiche, in Europa si è assistito ad una riduzione della mortalità per cancro del colon-retto superiore al 12% nei maschi e al 20% nelle donne negli ultimi anni. Anche se i risultati sono molto incoraggianti, in USA soltanto meno del 40% delle persone candidate allo screening si sottopone agli esami in questione, spesso a causa di imbarazzo, paura o disinformazione<sup>xxxix</sup>.

Categoria di rischio	Metodo di screening	Età di inizio screening
Medio <sup>§</sup>	Scegliere tra: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hemocult annuale</li> <li>• sigmoidoscopia flessibile ogni 5 anni</li> <li>• Hemocult annuale e sigmoidoscopia flessibile ogni 5 anni</li> <li>• clisma a doppio contrasto ogni 5 anni</li> <li>• colonscopia ogni 10 anni</li> </ul>	50 anni
Storia familiare positiva per tumore del colon-retto	Scegliere tra: <ul style="list-style-type: none"> <li>• colonscopia ogni 10 anni</li> <li>• clisma a doppio contrasto ogni 5 anni</li> </ul>	40 anni o 10 anni prima della diagnosi del membro familiare affetto più giovane
HNPCC	Colonscopia ogni 1-3 anni	21 anni
FAP	Sigmoidoscopia flessibile o colonscopia ogni 1-2 anni	Pubertà
Rettocolite ulcerosa (RCU)	Colonscopia con biopsia ogni 1-2 anni	7-8 anni dopo diagnosi di RCU

<sup>§</sup>Tutti gli individui asintomatici senza storia familiare o personale di neoplasia gastrointestinale, ovarica o uterina, senza altri fattori di rischio noti per cancro del colon-retto.

**Tab.2.8** Indicazioni di tipologia, frequenza ed età di inizio di screening per le diverse categorie di rischio<sup>32</sup>.

Un altro esame di screening da considerare è la sigmoidoscopia con strumento flessibile che consente il riconoscimento di oltre il 65% dei polipi. Ciononostante è da notare che circa la metà degli adenomi in fase avanzata (>1 cm) e dei cancri non sarebbero visualizzati perché presenti nella porzione prossimale del colon, non analizzata da questo tipo di esame. Nel caso in cui sia rilevata la presenza di lesioni sospette e siano presenti altri fattori di rischio per neoplasie del colon destro (età superiore ai 65 anni, storia familiare positiva per

cancro del colon o adenomi distali multipli), questa metodica è seguita da un follow-up con colonscopia totale. La riduzione della mortalità per cancro indotta dalla sigmoidoscopia oscilla tra il 59% e l'80% ed i valori più alti sono correlati all'uso in associazione con l'Hemocult. La *US Agency for Health Care Policy and Research* raccomanda l'impiego per lo screening con frequenza quinquennale<sup>32</sup>.

La colonscopia è comunque gravata da costi elevati, disagi e rischi per il paziente nell'esecuzione, con il rischio di possibili complicanze quali emorragie e perforazioni, rare e comunque legate all'esperienza dell'operatore.

Tra le nuove metodiche in corso di valutazione vi è l'analisi del DNA nelle feci, che consiste nella ricerca delle mutazioni tipiche del genoma della cellule neoplastiche della mucosa coloretale (per esempio alterazioni di *APC*, *K-ras*, *p53* o instabilità dei microsatelliti). Presenta una sensibilità quattro volte superiore a quella dell'Hemocult (51% vs 13%), ma non è ancora stata inserita negli attuali programmi di screening, probabilmente per gli alti costi e la scarsa accettabilità da parte dei pazienti (è necessario conservare al fresco il campione di feci).

Un altro esame di screening in fase di valutazione è la colonscopia virtuale (o colongrafia), caratterizzata dalla ricostruzione tridimensionale del colon sulla base delle informazioni fornite dalla TC addome (o più raramente di una risonanza magnetica). Sebbene di ugual costo e più accettata dal paziente rispetto alla colonscopia, non permette alcun procedimento di rimozione dei polipi e richiede l'utilizzo delle radiazioni. E' inoltre accompagnata da problemi legati all'interpretazione delle immagini e alla necessità di eseguire in ogni caso la colonscopia una volta identificata una lesione sospetta<sup>xl</sup>.

## 2.8 Prognosi

Nel paziente con cancro coloretale la prognosi è strettamente dipendente da numerosi fattori, tra i quali il più importante è sicuramente lo stadio, ovvero il

grado di penetrazione del tumore nella parete intestinale in combinazione con la presenza di un eventuale coinvolgimento linfonodale o metastasi a distanza, che condizionano la sopravvivenza globale e l'intervallo libero di malattia. Se, infatti, analizziamo i dati relativi alla sopravvivenza globale a 5 anni in relazione a questi ultimi parametri, è possibile comprendere il motivo della considerevole attenzione rivolta alla diagnosi precoce ed ai programmi di screening. Per le lesioni confinate alla sottomucosa (stadio T1) la sopravvivenza è dell'80-90% e si riduce al 60-70% quando viene superata la muscolare propria. In presenza di coinvolgimento linfonodale, la sopravvivenza a 5 anni scende dall'80% nei pazienti con linfonodi negativi al 45-50% in quelli con linfonodi positivi<sup>xli</sup>. Proprio a questo proposito, è opportuno ricordare che le attuali linee guida raccomandano l'analisi di almeno 12 linfonodi per una corretta stadiazione. Va anche sottolineato come circa il 75% di pazienti ai quali viene diagnosticato tale neoplasia è candidato ad un intervento chirurgico con intento radicale; il restante 25% presenta, già al momento della diagnosi, metastasi a distanza o una malattia localmente avanzata, quindi non suscettibile di un trattamento radicale. Questi pazienti hanno una sopravvivenza mediana di circa 9-12 mesi. In effetti, la stadiazione di Dukes fornisce precise informazioni prognostiche per quanto riguarda gli stadi estremi A e D, ma nella maggior parte dei pazienti, soprattutto quelli intermedi B e C si nota un'elevata variabilità nell'andamento clinico. Circa il 30-40% dei pazienti in stadio Dukes B sviluppa una recidiva locale e/o a distanza dopo chirurgia curativa<sup>xlii</sup>. Le ragioni di ciò non sono ancora del tutto chiare, lasciando spazio a numerose ipotesi: presenza di micrometastasi linfonodali, una resezione chirurgica insufficiente, una eccessiva manipolazione chirurgica con disseminazione di cellule tumorali maligne ed infine un comportamento biologico aggressivo del tumore stesso. A causa di tali problematiche, negli ultimi anni è nato un interesse specifico nella ricerca di altri fattori che possano rivestire un ruolo nella selezione dei pazienti a maggior rischio di ripresa della malattia e quali otterrebbero maggior beneficio da una terapia adiuvante.

Un altro parametro rilevante dal punto di vista prognostico è rappresentato dall'invasione vascolare che può essere distinta in invasione dei vasi linfatici e dei vasi ematici, entrambe correlate ad una più breve sopravvivenza. In particolare la presenza di invasione vascolare è fortemente predittiva di metastasi a distanza, prevalentemente epatiche<sup>xliii</sup>.

Recente rilievo ha assunto la ricerca di marcatori molecolari, come perdita di espressione di bcl-2, mutazioni del gene p53, secrezione di mucina, livelli ridotti di timidilato-sintetasi (enzima chiave nella sintesi del DNA, bersaglio della chemioterapia con 5-fluorouracile), alterazioni che sono state poste in relazione con i processi di metastatizzazione e con l'invasione locale della neoplasia<sup>1</sup>.

#### Fattori prognostici negativi per recidiva post-chirurgica di carcinoma coloretale

- Infiltrazione neoplastica oltre la parete intestinale (T4)
- Interessamento dei linfonodi regionali
- 4 o più linfonodi regionali interessati
- <12 linfonodi esaminati
- Infiltrazione vasi ematici o linfatici
- Invasione perineurale
- Alterazioni genetiche specifiche ( mutazioni di APC, instabilità dei microsatelliti, aneuploidia..)
- Basso grado di differenziazione
- Perforazione
- Occlusione
- Livelli plasmatici di CEA preoperatorio > 5,0 ng/ml
- Infiltrazione neoplastica dei margini chirurgici

Tab.2.9 Principali aspetti prognostici negativi per recidiva post-chirurgica di carcinoma coloretale<sup>3</sup>.



Stadio	Sopravvivenza a 5 anni
I	> 90 %
IIA	80-85 %
IIB	70-80 %
IIIA	65-80 %
IIIB	50-65 %
IIIC	25-50 %
IV	5-8 %

Tab.2.10 Percentuale di sopravvivenza a 5 anni in correlazione con lo stadio di malattia<sup>41</sup>.

## 2.9 Terapia

### 2.9.1 Terapia chirurgica

L'approccio terapeutico al cancro del colon retto è, in prima istanza, esclusivamente chirurgico e la resezione colica rimane a tutt'oggi condizione necessaria per prospettare la guarigione al paziente. Il tipo di intervento può variare a seconda che l'intento sia terapeutico o palliativo. Per quanto riguarda le lesioni polipoidi benigne, nel corso degli ultimi trent'anni la loro asportazione (polipectomia) è stata effettuata nella stragrande maggioranza dei casi e sempre più frequentemente, per via endoscopica con strumenti flessibili. Qualora l'asportazione di queste lesioni non sia effettuabile endoscopicamente si procede ad una resezione chirurgica segmentaria, del tratto colico interessato. Inoltre, nel 1983 Buess ha sviluppato una nuova tecnica per il trattamento combinato endoscopico-chirurgico dei tumori del retto, chiamata "transanal endoscopic microsurgery" (TEM). L'esecuzione di tale intervento consente la precisa dissezione e la rimozione radicale sia nelle lesioni benigne sia in casi selezionati di lesioni maligne. Tuttavia, essa necessita di uno strumentario dedicato e di un'equipe medica esperta e le indicazioni al suo utilizzo sono

molto limitate.

Premesso questo, in generale, il tipo di intervento dipende dalla sede della lesione.

Partendo dalle lesioni localizzate del tratto prossimale del colon, comprendente il cieco, il colon destro, fino alla porzione intermedia del colon trasverso l'intervento chirurgico radicale consiste in un'emicolectomia destra con alcune minime varianti a seconda della precisa localizzazione della lesione.

L'emicolectomia destra consiste nell'asportazione di circa 15-25 cm di ileo terminale, del colon ascendente, di parte del colon trasverso, dell'omento con legatura e sezione, sull'asse mesenterico, dei vasi colici medi, colici destri ed ileo-cieco-colici. Nelle lesioni con sede più prossimale la sezione sull'ileo terminale deve cadere almeno 20 cm a monte della valvola ileo-ciecale, ma non è obbligatoria la legatura e sezione dei vasi colici medi all'origine, così come non è obbligatoria l'omentectomia della metà destra del colon trasverso. Questa, al contrario, è obbligatoria per le forme più distali del colon destro con la legatura e sezione dei vasi gastroepiploici destri rispettivamente all'origine ed allo sbocco per l'arteria e la vena (Fig.2.12).

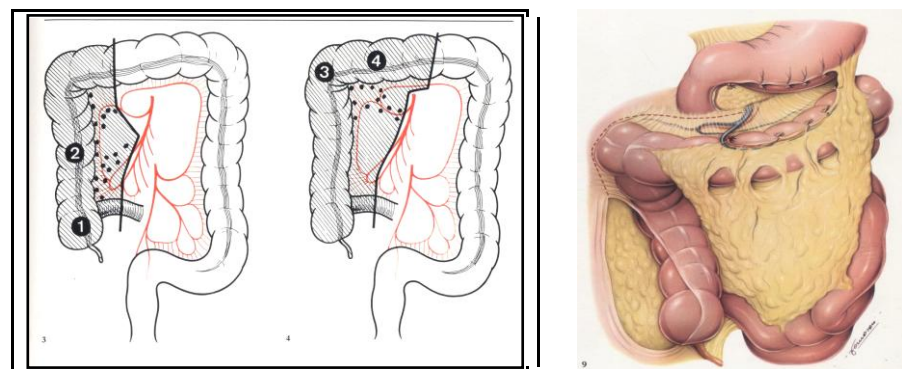


Fig.2.12 *Emicolectomia destra*

La legatura all'origine dei vasi gastroepiploici destri e la sezione del legamento gastroepiploico sono di consueta esecuzione in chirurgia tradizionale, mentre in laparoscopica, rappresentano un tempo chirurgico tecnicamente molto

complesso. Tuttavia, nonostante le difficoltà tecniche, non è lecito sacrificare la radicalità oncologica all'approccio laparoscopico. Un'emicolectomia destra è sempre seguita da un'ileo-trasversostomia o latero-laterale, nella maggior parte dei casi, o termino-terminale (Fig.2.13), più raramente.

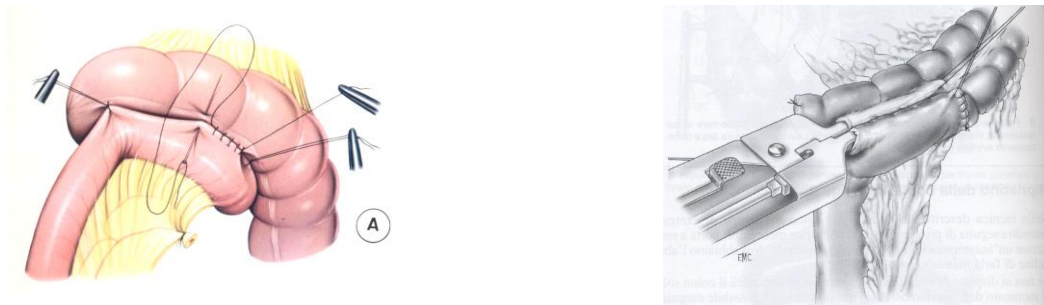


Fig.2.13 *Ileotrasversostomia*

Qualunque tecnica per confezionare l'anastomosi venga eseguita, sia essa meccanica o manuale, l'emicolectomia destra non pone particolari problemi tecnici.

Inoltre, il decorso post-operatorio è generalmente privo di complicanze, fatta eccezione per transitori ed incostanti problemi di incremento del numero delle evacuazioni giornaliere che gradualmente si riducono spontaneamente in poco tempo.

Le lesioni localizzate in prossimità della flessura sinistra, sia che si trovino sul versante del colon trasverso sia che si trovino sul versante del discendente, possono essere trattate sostanzialmente in due modi. Il primo è la cosiddetta colectomia intermedia che consiste nell'asportazione del colon trasverso e della porzione prossimale del colon discendente con omentectomia e legatura e sezione del ramo sinistro della colica media e del ramo ascendente della colica sinistra (Fig.2.14).

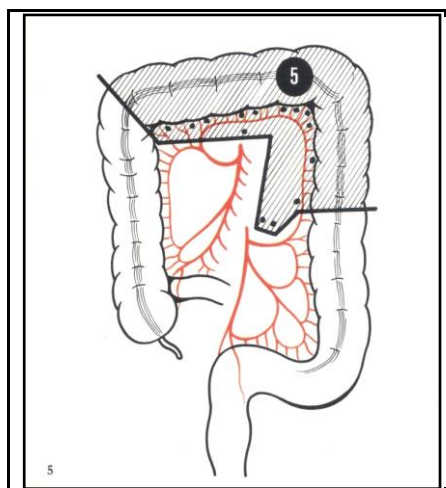


Fig.2.14 *Colectomia intermedia*

La colectomia intermedia, tuttavia, può non essere totalmente soddisfacente sotto il profilo della linfadenectomia; è infatti, evidente come, rispettando i criteri di radicalità oncologica, si dovrebbe ricorrere alla legatura dei vasi colici medi sull'asse mesenterico e della colica sinistra all'origine. Questo tempo chirurgico, tuttavia, pone dei problemi di difficile soluzione in relazione alla vascolarizzazione della successiva anastomosi e quindi, in alternativa alla colectomia intermedia, va considerata la possibilità di eseguire una colectomia sub-totale con ileo-sigmoidostomia. Quest'intervento offre una maggiore garanzia di radicalità oncologica a discapito di un più elevato impegno post-operatorio per il paziente.

Le neoplasie del colon discendente, del sigma e del terzo superiore del retto sono accomunate dallo stesso tipo di intervento chirurgico. L'intervento consiste nella resezione anteriore del retto che prevede come tempi chirurgici essenziali la mobilizzazione del colon discendente nel piano avascolare di Toldt, la mobilizzazione od abbattimento completo della flessura colica sinistra, la legatura e sezione della vena mesenterica inferiore al margine inferiore del pancreas, la legatura e sezione dell'arteria mesenterica inferiore ad 1 cm dall'origine. Importante a tale livello è l'attenzione che il chirurgo deve porre a mantenere l'integrità delle strutture nervose, localizzate anteriormente al piano aortico, attuando la "*nerve sparing technique*" descritta da Heald. Grazie a questa

tecnica si riesce, in pratica, a ridurre sensibilmente il numero delle complicanze inerenti la sfera sessuale ed urinaria, che troppe volte conseguivano, in passato, agli interventi di resezione anteriore e di amputazione addomino-perineale del retto. L'intervento prosegue con la sezione del colon discendente in relazione alla vascolarizzazione, la preparazione, quindi, del retto con tecnica *nerve sparing* fino ad almeno 3 cm sotto il promontorio sacrale e sezione del mesoretto a questo livello (Fig.2.15).

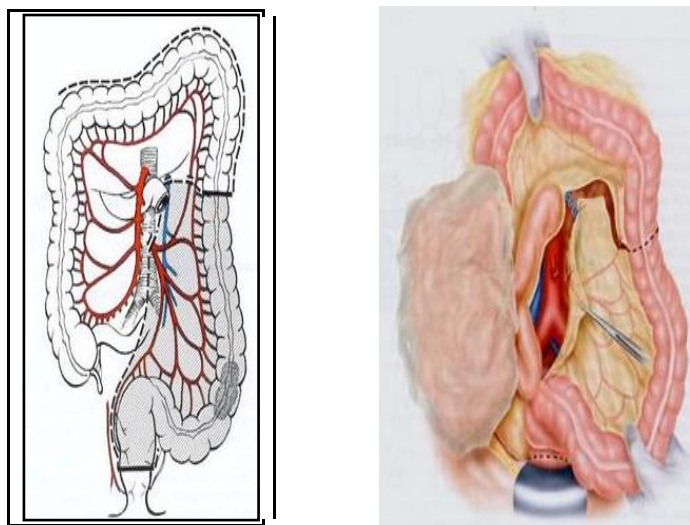


Fig.2.15 Resezione anteriore del retto

Qualora il tumore sia del terzo prossimale del retto la sezione del mesoretto deve avvenire 5 cm al di sotto della sede del tumore.

L'anastomosi viene eseguita solitamente con una suturatrice meccanica, CEEA 29 o 31 in relazione al calibro del retto, e consiste in un'anastomosi colo-rettale termino-terminale. Lievemente diverso è il discorso se l'intervento viene condotto in laparoscopia nel qual caso la tecnica di anastomosi usata è quella secondo Knight-Griffen, nata, in realtà, per la ricostruzione in caso di interventi resettivi più bassi.

Proprio per il fatto che si tratta di un'anastomosi eseguita in sicurezza, il rischio di deiscenza post-operatoria è modesto e, quindi, raramente si presenta la

necessità di proteggerle, escludendole dal transito delle feci, mediante un'ileostomia od una colostomia sul colon trasverso, entrambe temporanee, che potranno, poi, essere richiuse a 2-3 mesi di distanza dall'intervento.

Un altro tipo di intervento che può trovare indicazione nel trattamento del cancro del sigma-retto è la resezione anteriore del retto secondo Hartmann, la quale consiste nella resezione colica senza ripristino della continuità intestinale lasciando, cioè, il retto escluso ed affondato, mediante la realizzazione di una colostomia sul moncone prossimale del colon. L'indicazione a questo intervento è rappresentata, nella maggior parte dei casi, dalla condizione di urgenza (occlusione) oppure da situazioni particolari che controindicano l'esecuzione dell'anastomosi, come ad esempio l'inadeguata vascolarizzazione del viscere.

I cancri del terzo medio e del terzo inferiore del retto hanno sotto il profilo terapeutico caratteristiche comuni. In primo luogo, spesso la chirurgia è preceduta da un trattamento radiochemioterapico neo-adiuvante, grazie al quale è possibile ottenere un *downstaging* della lesione e, pertanto, eseguire interventi chirurgici meno demolitivi. In secondo luogo negli stadi più iniziali e in condizioni particolari possono essere trattati anche per via trans- anale, come già precedentemente descritto.

Gli interventi eseguibili sono analoghi alla resezione anteriore descritta per le lesioni del discendente-sigma, ma diversificano da questa nella fase di preparazione del retto. Per le neoplasie con queste localizzazioni è essenziale, infatti, eseguire la cosiddetta *total mesorectal excision*<sup>xliv</sup>, con l'esecuzione di anastomosi molto basse immediatamente al di sopra del piano degli elevatori. Di per sé la distanza della sezione viscerale dal limite distale della lesione, in questa sede, può essere anche di un solo centimetro. Nelle resezioni che comportano la *total mesorectal excision*, solitamente, l'anastomosi viene eseguita al di sopra del piano degli elevatori con la tecnica di Knight-Griffen, dal momento che a questo livello è tecnicamente molto difficile, se non impossibile, eseguire anche in "aperto" un'anastomosi colo-rettale termino terminale con una suturatrice circolare. Si ricorre, pertanto, all'anastomosi secondo Knight-Griffen

che consiste nell'affondamento-sezione del monconcino del retto con una TA, con una Roticulator o meglio con una EndoGia in modo tale da non dovere eseguire, in sede così bassa, una borsa di tabacco che sarebbe tecnicamente molto difficile. L'introduzione della cucitrice avviene dal canale anale con il consueto "spillone" che consente la realizzazione dell'anastomosi (Fig.2.16).



**Fig.2.16** Anastomosi meccanica sec. Knight-Griffen

In presenza di neoplasie localizzate in prossimità della linea pettinata, spesso non è possibile eseguire l'anastomosi meccanica con le suturatrici circolari a disposizione. Pertanto, è necessario cambiare tecnica ricostruttiva e l'opzione più adeguata è rappresentata da un'anastomosi coloanale manuale eseguita per via perineale<sup>xlv</sup>.

Talora il moncone anorettale è così corto e lo spazio per l'anastomosi è tanto esiguo che risulta impossibile introdurre la cucitrice per via transanale ed è, quindi, necessario eseguire un'anastomosi colo-anale introducendo "a mo' di telescopio" il colon nel monconcino residuo e confezionare un'anastomosi a punti staccati immediatamente a monte della linea pettinata prendendo col punto a tutto spessore la parete del colon prossimale, mentre la sola mucosa e lo sfintere liscio dalla parte del retto-canale anale (Fig.2.17).

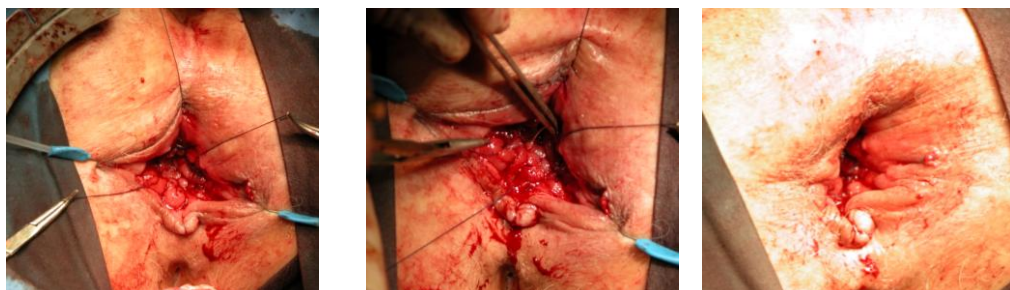


Fig.2.17 Anastomosi manuale colo-ano

Nel caso in cui ci troviamo di fronte a lesioni localizzate in prossimità della linea pettinata o lesioni avanzate del retto inferiore, spesso non è possibile la ricanalizzazione del paziente. Per non venir meno ai principi di radicalità oncologica, l'intervento di scelta in questi casi è rappresentato dall'amputazione del retto secondo Miles. Questo intervento è costituito da una parte addominale, analoga a quella necessaria per qualsiasi lesione del retto, abbinata ad un tempo perineale che prevede l'asportazione in blocco del retto, canale anale e dell'apparato sfinteriale, con confezionamento di una colostomia definitiva sul moncone prossimale del colon.

Negli ultimi anni l'introduzione nella pratica chirurgica della laparoscopia ha consentito, una volta superata la curva di apprendimento, una più dettagliata ed ingrandita visione e, pertanto, un miglioramento nella qualità tecnica dell'intervento.

In particolare, l'avvento della tecnica laparoscopica ha consentito di ripuntualizzare le conoscenze anatomiche e, per quanto concerne le neoplasie del retto, grazie alla magnificazione delle immagini è più facile il riconoscimento delle strutture e dei piani di dissezione, una migliore realizzazione della *nerve-sparing technique*, con conseguenti risultati più soddisfacenti sotto il profilo funzionale.

Nella gestione dei pazienti affetti da tumore del colon-retto in fase metastatica sono state impiegate diverse modalità terapeutiche: chirurgia, chemioterapia sistemica e locoregionale, terapie ablative. Il trattamento di scelta è prevalentemente quello chemioterapico, che ha ottenuto il miglior beneficio clinico in termini di aumento della sopravvivenza e di prolungamento dell'intervallo libero da sintomi, associato ad un miglioramento della qualità della vita. La somministrazione del farmaco può avvenire per via sistemica



attraverso infusione endovenosa oppure per via locale attraverso infusione endoarteriosa epatica.

Nel caso di una localizzazione epatica la chirurgia riveste un ruolo fondamentale. La resezione epatica è, infatti, la strategia migliore nel caso di pazienti con malattia resecabile e non ci sono al momento evidenze scientifiche che debba essere seguita da alcun trattamento adiuvante. Quando siamo in presenza di malattia non resecabile, invece, abbiamo a disposizione numerose tecniche alternative, tra le quali la chemioterapia endoarteriosa palliativa mediante pompe impiantabili o porth arteriosi sembrano dare i risultati in termini di allungamento della sopravvivenza.

Le altre tecniche ablativo, radiofrequenza, crioablazione, radioterapia stereotassica, chemioembolizzazioni, sono invece metodiche da un lato promettenti, ma ancora in parte sperimentali.

### *2.9.2 Terapia adiuvante*

In particolare per il cancro del retto, la storia naturale dopo l'intervento chirurgico è caratterizzata dalla probabilità di recidivare, non solo a distanza, ma anche localmente, per la persistenza di cellule neoplastiche a livello dei vasi della ricca rete linfatica presente nel tessuto adiposo perirettale. L'incidenza di recidive locali per lesioni primitive rettali, classicamente riportata dopo l'intervento chirurgico radicale, dipende dallo stato di diffusione della malattia al momento dell'intervento: è inferiore al 5-10% nelle neoplasie intraparietali (T1-T2), sale al 15-30% in presenza di invasione extra-parietale (T3) e al 35-45% quando esiste anche un interessamento dei linfonodi loco-regionali.<sup>xlvi</sup> La recidiva locale è inoltre molto più frequente quando la neoplasia è localizzata nel tratto extraperitoneale del retto, mentre le neoplasie del retto intraperitoneale si comportano piuttosto come quelle del sigma, dando luogo

preferenzialmente a metastasi peritoneali ed epatiche. La recidiva è, spesso, seguita a breve, in un numero elevato di casi, dalla comparsa di metastasi a distanza con, pertanto, una prognosi ancora più sfavorevole. Inoltre, le neoplasie del retto extraperitoneale possono metastatizzare anche a livello polmonare, saltando il filtro epatico, più frequentemente delle lesioni intraperitoneali per l'interessamento dei vasi retroperitoneali tributari delle vene ipogastriche.

Nel loro insieme le precedenti osservazioni hanno costituito il razionale per l'introduzione, fin dagli anni sessanta, di terapie adiuvanti e neoadiuvanti principalmente mirate a ridurre l'incidenza di recidive locali, obiettivo considerato clinicamente rilevante per la qualità della vita anche indipendentemente dall'effetto sulla sopravvivenza. Radioterapia e chemioterapia hanno avuto, a questo fine, una larga diffusione in associazione alla chirurgia, ma con modalità di impiego ed indicazioni assai varie che hanno reso particolarmente difficile definire criteri univoci.

In particolare l'associazione concomitante di radioterapia e chemioterapia con 5-FU in infusione continua, ovvero protratta per tutto il corso della radioterapia, rappresenta, al momento attuale, il trattamento neoadiuvante più consolidato del cancro del retto. Questo trattamento dovrebbe essere riservato alle neoplasie a sede nel retto extra-peritoneale, a diffusione extra-parietale (T3-T4) e/o con interessamento linfonodale locoregionale (N1).

La disponibilità di metodiche di diagnostica per immagini in grado di definire il livello di infiltrazione parietale della malattia con elevata accuratezza favorisce l'indicazione alla terapia adiuvante in fase preoperatoria. Il trattamento preoperatorio ha una migliore tolleranza, consente un più largo impiego di interventi con conservazione dello sfintere, migliora la radicalità della exeresi ed ha una applicabilità più larga.

Il grado di *downstaging* può inoltre essere impiegato per valutare l'opportunità di una chemioterapia adiuvante; tale trattamento potrebbe essere omesso nei pazienti con risposta patologica completa per il carattere prognostico che questa

sembra avere.

Con l'impiego della radiochemioterapia adiuvante e neoadiuvante e della TME, è possibile ridurre il rischio di recidive locali al 5-10%; rimane tuttavia una categoria di pazienti con malattia localmente avanzata, infiltrante la fascia mesorettale, classificabili come T3 estesi o T4, per i quali il controllo locale è ancora insoddisfacente e che mantengono un'incidenza di recidive locali pari al 20-25% anche dopo radiochemioterapia con gli schemi usuali. Per questi pazienti esiste l'indicazione alla ricerca di nuove modalità di trattamento con dosi intensificate di radioterapia e impiego di nuovi farmaci in associazione.

Nella gestione dei pazienti affetti da carcinoma del colon-retto in fase metastatica vengono impiegate diverse modalità terapeutiche. Il trattamento chemioterapico rappresenta il fulcro delle possibilità terapeutiche disponibili. La probabilità di guarigione di un paziente affetto da carcinoma del colon-retto in fase avanzata è molto bassa, per tale motivo potrebbe essere difficile giustificare un trattamento aggressivo. Per ottenere la palliazione, tuttavia, esistono evidenze che la chemioterapia può ottenere un beneficio clinico in termini di aumento della sopravvivenza e di prolungamento dell'intervallo libero da sintomi senza ridurre la qualità della vita. Al contrario, un atteggiamento attendista può ridurre la sopravvivenza.

Per oltre quarant'anni il 5-FU è stato l'unica possibilità terapeutica. Negli ultimi anni si sono affacciate alla pratica clinica nuove molecole dotate di attività antineoplastica. Alcune di queste rappresentano la rivisitazione del 5-FU essendone dei profarmaci, altri impiegano gli stessi meccanismi d'azione, altri ancora impiegano meccanismi d'azione differenti e non cross-resistenti.

Inoltre, con il miglioramento delle tecniche di biologia molecolare degli anni recenti, l'analisi delle alterazioni genetiche delle cellule tumorali è divenuta più semplice ed accurata. Studi di laboratorio hanno identificato siti molecolari nei tessuti tumorali che potrebbero servire come *target* specifici per il trattamento. Il *goal* di questa strategia terapeutica è rappresentato dall'interruzione delle tappe essenziali per la crescita, la sopravvivenza e la metastatizzazione tumorale, e,

potenzialmente, anche la riduzione degli effetti tossici associati ad un trattamento chemioterapico citotossico poco specifico.

Attualmente, quindi, sono stati introdotti nella gestione terapeutica del cancro del colon-retto avanzato due promettenti classi di anticorpi monoclonali: gli antagonisti del recettore per il fattore di crescita epidermico (EGF receptor) e gli inibitori dell'angiogenesi.<sup>xlvi</sup>

Il blocco del recettore dell'EGF, overespresso nel tessuto tumorale, è ottenuto dall'anticorpo Cetuximab (conosciuto anche come C-225) diretto contro il dominio extracellulare del recettore stesso.<sup>xlvi</sup> I dati finora raccolti suggeriscono come il Cetuximab sia effettivamente efficace in un sottogruppo di pazienti con cancro colon-rettale avanzato, anche se i *trials* finora condotti hanno incluso solamente pazienti con evidenze immunoistochimiche dell'espressione del recettore dell'EGF.

Il Bevacizumab è, invece un anticorpo diretto contro il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) studiato, in combinazione con il trattamento chemioterapico, in molti *trials* clinici.<sup>xli</sup> Uno di questi mostra il trattamento con l'associazione di Bevacizumab in combinazione con qualsiasi regime terapeutico contenente fluorouracile come prima linea terapeutica in pazienti con cancro del colon-retto avanzato.

### 3. BIOLOGIA MOLECOLARE

La cancerogenesi è un processo multifasico durante il quale si verificano alterazioni genetiche cumulative che conducono alla trasformazione della cellula da normale a maligna. A tali aspetti genetici corrispondono conseguentemente modificazioni biomolecolari, il cui riconoscimento può essere utile nella comprensione dello sviluppo del tumore e nel suo trattamento. La cellula neoplastica, infatti, presenta una disregolazione dei propri processi biologici, come il mancato controllo della proliferazione ed apoptosi, la perdita della differenziazione e la disseminazione metastatica, che si correlano a modificazioni dell'espressione di molecole regolatrici l'omeostasi cellulare.

I geni coinvolti sono raggruppati in *anti-oncogeni*, o geni onco-soppressori (p53, APC, DCC, MCC, ecc.), che modulano in senso negativo il processo di proliferazione favorendo invece la differenziazione cellulare, ed in *proto-oncogeni*, cioè geni coinvolti ancora una volta nel processo di proliferazione cellulare in quanto codificanti per recettori dei fattori di crescita (c-sys, c-erb-B/Neu, c-erb-A, ecc.), fattori di trascrizione nucleare (c-myc, c-fos, c-jun, ecc.) e proteine intracellulari trasduttrici del segnale di crescita (c-ras, c-abl, ecc.). È stato identificato un terzo gruppo di mutazioni che non modificano direttamente la biologia della cellula neoplastica, ma determinano l'*instabilità genetica* che a sua volta contribuisce all'accumulo di ulteriori eventi mutazionali sia negli oncogeni che negli onco-soppressori.

Il tumore del colon-retto rappresenta una delle poche neoplasie in cui sia stata identificata con precisione la successione delle alterazioni genetiche e molecolari conducenti alla trasformazione della mucosa colica normale in adenocarcinoma. La progressione dei fenomeni che portano alla genesi del fenotipo maligno a

partire dall'epitelio intestinale sano è detta "sequenza adenoma-carcinoma", spiegata dal modello di Fearon e Vogelstein (Fig.3.1). Secondo questo, il primo evento mutazionale (*first hit*), congenito o acquisito, coinvolge il gene oncosoppressore APC (*adenomatous polyposis coli*), mappato sul cromosoma 5q21 e codificante per una proteina che promuove la migrazione cellulare e, attraverso l'interazione con la  $\beta$ -catenina, regola la trasduzione del segnale mitogenico in senso inibitorio.

In seguito ad una successiva mutazione (*second hit*) interessante il secondo allele APC, si verifica la formazione di cripte aberranti (*Aberrant Crypt Foci*, ACF), piccole lesioni displastiche nell'epitelio del colon. Queste formano, espandendosi oltre misura, un polipo adenomatoso, neoformazione aggettante nel lume intestinale di natura precancerosa da cui potrà originare, a seguito di altre mutazioni, un carcinoma.

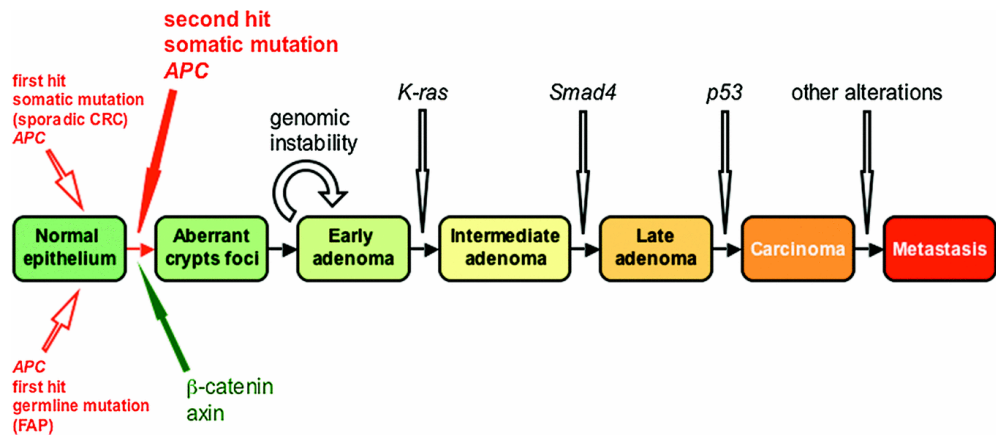


Fig.3.1 Modello di Fearon e Vogelstein della sequenza adenoma-carcinoma

Il susseguirsi e l'accumularsi nel tempo (da notare che la sequenza adenoma-carcinoma necessita di circa 15-20 anni per completarsi) di ulteriori mutazioni determina l'evoluzione verso l'adenocarcinoma e la capacità di generare metastasi. I geni coinvolti in fase più avanzata sono per esempio k-ras, proto-oncogene con funzione di trasduzione di segnali intracellulari, DCC e p53, oncosoppressori la cui inattivazione induce alla perdita del controllo del ciclo

cellulare e dell'induzione dell'apoptosi.

Ricordiamo, quindi, che nessuna alterazione genetica singola è in grado da sola di determinare lo sviluppo della neoplasia, ma unicamente la sommatoria delle diverse alterazioni genetiche può innescare e completare la cancerogenesi. Solo una minoranza degli adenomi (circa il 6%) si trasformerà in neoplasia maligna. Allo scopo di migliorare la comprensione di tali meccanismi all'origine del tumore, la ricerca scientifica è indirizzata verso lo studio di altri prodotti genici che si pensa siano di notevole utilità nell'analisi delle cellule neoplastiche. Tra questi, per quanto riguarda il cancro del colon-retto forse il più studiato è l'antigene carcinoembrionale (CEA), mentre ve ne sono molti altri recenti come *p16*, *p27* e *PTEN*, dei quali non conosciamo ancora chiaramente il ruolo.

L'antigene carcinoembrionale (CEA) è una glicoproteina localizzata sulla superficie apicale degli enterociti maturi con la funzione principale di molecola di adesione cellulare. Fu descritta per la prima volta nel 1965 da Gold e Freedman, quando questi identificarono un antigene presente sia nella mucosa del colon fetale che nell'adenocarcinoma del colon, ma assente nel colon di adulto sano. Poiché la proteina è stata ritrovata solo nel tessuto embrionale e neoplastico, le fu attribuito il nome di antigene carcinoembrionale. Gli studi seguenti hanno evidenziato la sua presenza anche nei tessuti sani, ma con concentrazioni circa 60 volte inferiori rispetto ai tessuti neoplastici. Infatti, alti valori non sono mai stati riscontrati in soggetti sani, pazienti con tumori non-gastrointestinali o patologie benigne gastrointestinali. Sebbene tali scoperte non siano mai state confermate, è ormai comune l'uso del CEA come marker del cancro coloretale.

Il *p16* ed il *p27* rappresentano due inibitori enzimatici delle chinasi ciclina-dipendenti (*cyclin-dependent kinases*, *cdk*), proteine regolanti la progressione delle diverse fasi del ciclo cellulare. Rispettivamente, *p16* appartiene alla famiglia di inibitori INK4, che blocca le *cdk4*, mentre *p27* alla famiglia Cip/Kip, avente un ampio numero di bersagli molecolari (ciclina D-*cdk4*, ciclina E-*cdk2*, ciclina A-*cdk2*). Attraverso un complesso meccanismo di interazioni molecolari, tali

inibitori controllano la proliferazione cellulare in modo da impedire lo sviluppo di un fenotipo maligno caratterizzato da una crescita cellulare incontrollata. È stato infatti osservato come l'espressione di tali marcatori sia correlata con la sopravvivenza di alcune neoplasie, come ad esempio quella in sede coloretta.

*PTEN* rappresenta una proteina codificata dall'omonimo gene oncosoppressore, localizzato sul cromosoma 10, e possiede un'azione defosforilasica che agisce sui fosfolipidi generati dall'attività di PI3K, molecola coinvolta nell'inibizione dell'apoptosi e nell'induzione della proliferazione cellulare. *PTEN* antagonizza l'attività di PI3K regolando una moltitudine di processi cellulari come angiogenesi, motilità, invasività, sopravvivenza e proliferazione, ognuno dei quali coopera nella genesi e/o nel mantenimento di un fenotipo maligno. Sebbene l'attività fosforilasica sui lipidi rappresenti il punto fondamentale del suo ruolo oncosoppressivo, *PTEN* interagisce anche con molecole chiave come la proteina *p53*. Mentre studi iniziali riferivano come le mutazioni del gene *PTEN* fossero rare nel tumore del colon, ricerche più recenti hanno dimostrato un'incidenza approssimativa del 18% di tali alterazioni geniche coinvolgenti *PTEN* nel cancro coloretta.

Particolare attenzione deve essere posta, inoltre, proprio anche al gene oncosoppressore *p53*, frequentemente colpito da mutazioni conducenti alla genesi del tumore del colon-retto. Le alterazioni di *p53*, come già osservato in precedenza, che avvengono generalmente in una fase intermedio-tardiva del processo di cancerogenesi colo-rettale, inducono una resistenza all'apoptosi ed alla trascrizione di geni per il fattore inducibile dell'ipossia (*HIF-1*), a sua volta in grado di indurre la trascrizione genica del *Vascular Endothelial Grow Factor* (*VEGF*), molecola determinante nell'induzione della neo-angiogenesi. Questa rappresenta un fenomeno molto importante per lo sviluppo di una lesione neoplastica e può costituire un bersaglio terapeutico nel trattamento chemioterapico antitumorale grazie ai nuovi farmaci inibitori dell'angiogenesi.



#### 4. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare la presenza e l'espressione quantitativa relativa mediante PCR Real-Time di CEACAM3 nel sangue periferico di pazienti sottoposti ad intervento chirurgico per cancro del colon-retto, al fine di identificare la presenza di eventuali cellule tumorali circolanti nel sangue periferico. Abbiamo, inoltre, valutato la presenza di una possibile correlazione tra l'espressione di CEACAM3 con lo stadio clinico del tumore, in modo da evidenziare un possibile ruolo prognostico della loro espressione.

## 5. MATERIALI E METODI

### 5.1 Pazienti

Sono stati inclusi nello studio 38 pazienti, sottoposti ad intervento chirurgico radicale per adenocarcinoma del colon presso la Chirurgia Generale e d'Urgenza 2 della AOU Careggi- Firenze, nell'anno 2009. La ricerca della presenza e della espressione quantitativa relativa di CEACAM3 nel sangue periferico dei pazienti sottoposti ad intervento è stata effettuata presso il Laboratorio di Biologia Molecolare della SOD di Istologia Patologica e Diagnostica Molecolare della AOU Careggi-Firenze.

Dei sopradetti 38 pazienti, 25 sono di sesso maschile e 13 di sesso femminile, con età media di 69 anni (range 46-88 anni).

La suddivisione dei pazienti in base al sesso è visibile nella seguente tabella.

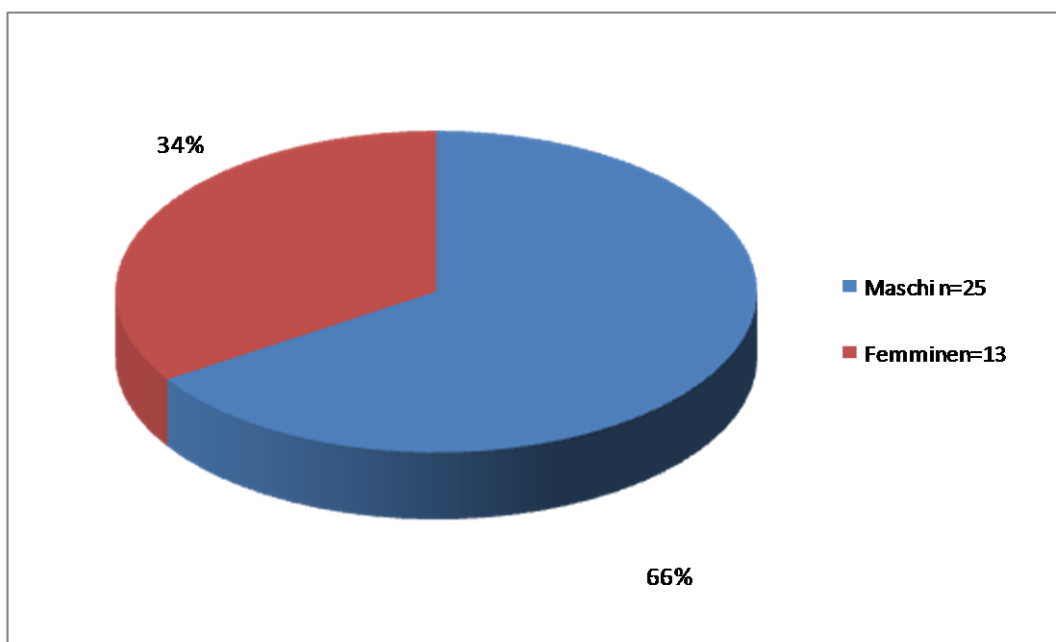


Tabella 5.1 Distribuzione per sesso.

Le distribuzioni in base alla sede ed allo stadio della malattia sono riportate rispettivamente nelle tabelle 5.2 e 5.3.

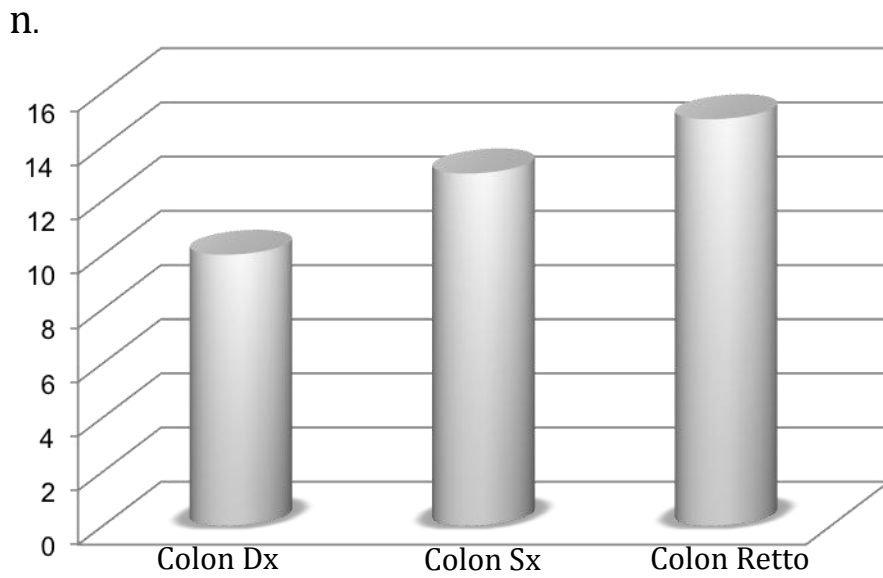


Tabella 5.2 Distribuzione per sede del tumore.

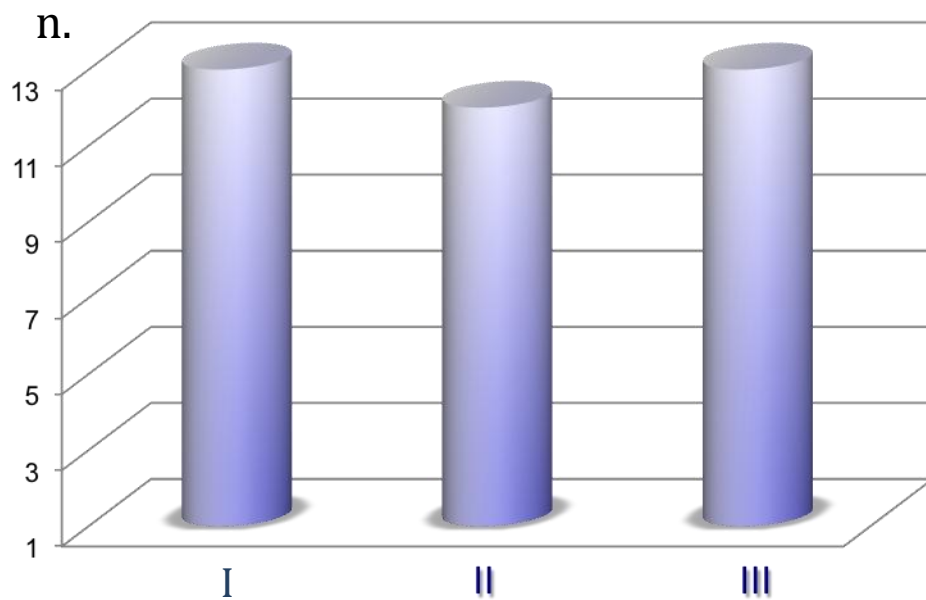


Tabella 5.3 Distribuzione in base alla stadiazione di Dukes.

La casistica è stata inoltre suddivisa in base alla tecnica chirurgica utilizzata: laparoscopica o tradizionale ( open) (Tab.5.4).

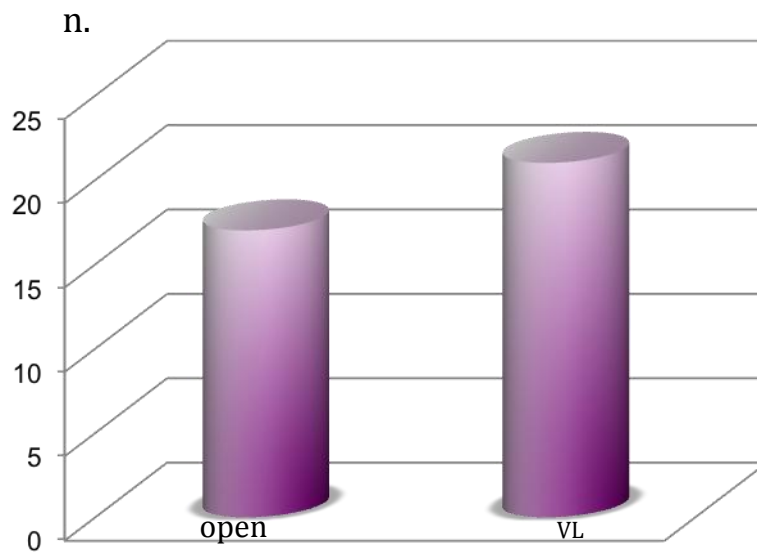


Tabella 5.4 Distribuzione della casistica in base alla tecnica chirurgica.

## 5.2 Tecniche

### 5.2.1 Isolamento dell'RNA

Il campione di sangue intero è stato scongelato. Un volume di sangue intero è stato risospeso in un volume di PBS (Phosphate Buffered Saline) e in due volumi di Purification Lysis Solution (Applied Biosystems, Foster City, CA). L'RNA è stato isolato usando il 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, Foster City, CA) secondo il protocollo del costruttore, e successivamente conservato a -80°C. La concentrazione e la purezza dell'RNA sono state valutate spettrofotometricamente misurando la loro assorbanza a 260 e a 280 nanometri. Lo stato di frammentazione dell'RNA è stato analizzato con gel di agarosio all'1,5%.

### 5.2.2 Real-Time PCR quantitativa

Tutti i campioni di RNA (200 ng ciascuno) sono stati retrotrascritti a cDNA usando l'iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad, Hercules, CA) secondo il protocollo del costruttore. La retrotrascrizione è stata eseguita anche su un campione di controllo senza RNA.

La Real-Time PCR quantitativa con metodologia TaqMan è stata eseguita su un ABI PRISM 7000 Sequence Detector System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Per il CEACAM sono stati utilizzati primers gene-specifici e una sonda marcata con FAM (Assay on Demand, Applied Biosystems, Foster City, CA). Per il gene GADPH, usato come gene endogeno di controllo per la normalizzazione, sono stati utilizzati primer gene-specifici e una sonda marcata con VIC (Applied Biosystems, Foster City, CA).

La reazione PCR è stata eseguita in triplice copia su una piastra da 96 pozzetti con 20 µl di volume finale, usando la 1x TaqMan Universal PCR MasterMix. Dopo un'incubazione di 2 minuti a 50°C ed 10 minuti a 95°C, la reazione è continuata per 50 cicli a 95°C per 15 secondi e a 60°C per un minuto.

### *5.2.3 Analisi dei risultati*

Alla fine della reazione, i risultati sono stati valutati usando il software ABI 7000 PRISM e i valori di Ct sono stati riportati su Microsoft Excel. L'espressione dei geni nel sangue intero dei pazienti con il cancro del colon è stata paragonata con l'espressione media dei geni di sei campioni di sangue intero di pazienti con mucosa sana del colon, utilizzati come campioni di controllo. Il metodo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  descritto da Livak et al. è stato utilizzato per analizzare i risultati. Per tutti i calcoli successivi è stata utilizzata la media dei valori di Ct per ogni serie di tre reazioni.

### *5.2.4 Analisi statistiche*

La differenza del livello di espressione relativa dei geni nella mucosa con cancro del colon e nella mucosa normale è stata calcolata attraverso il Wilcoxon test. L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando il software statistico SPSS versione 14.0 (Chicago,IL). Un valore di  $P \leq 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo.

## 6. RISULTATI

Sono stati studiati 266 prelievi di 38 pazienti, sottoposti consecutivamente ad intervento chirurgico per cancro del colon presso la Chirurgia Generale e d'Urgenza 2 di Firenze.

Tutti i prelievi sono stati eseguiti il giorno precedente l'intervento, in prima ed in quinta giornata dopo l'intervento chirurgico, durante l'intervento chirurgico rispettivamente dalla vena ileo colica per i colon destri e mesenterica superiore per i colon sinistri e i retti, a sei mesi ed a 12 mesi, e sono stati, poi, confrontati con quelli effettuati in una popolazione sana di controllo negativa per malattie intestinali infiammatorie croniche, neoplasie e virus epatotropi, costituita da 10 pazienti.

Dei 38 pazienti, 12 erano in stadio I, 12 in stadio II e 14 in stadio III C.

L'RNA della proteina, CEACAM3, è stato estratto con successo da tutti i campioni in esame. La concentrazione e la purezza dell'RNA sono state quantificate tramite analisi spettrofotometrica, misurando l'assorbanza a 260 nm ed a 280 nm.

E' stata, inoltre, valutata l'espressione dell'RNA della proteina GAPDH ad ulteriore conferma dell'attendibilità del campione in esame.

### 6.1 *Espressione del CEA*

Il CEA è risultato espresso in tutti i 228 campioni di sangue dei soggetti affetti da cancro del colon. Al contrario, nei 10 prelievi dei 10 pazienti sani non è stata evidenziata alcuna sua espressione.

Prendendo la media dei valori di tutti i pazienti della giornata prima dell'intervento chirurgico come tempo zero, si è successivamente valutato l'andamento delle medie in I, V giornata a sei mesi dopo l'intervento chirurgico. Vedi Tabella a seguire.

Tabella 1

Variable	N	Mean	Std Dev	Median	Minimum	Maximum
t0	38	4.0103684	2.4223552	3.5440000	-2.8100000	8.3580000
t1	38	3.4284395	2.6901825	3.0220000	-5.7660000	7.4520000
t5	38	3.4554737	2.2107727	3.2635000	-0.9460000	7.3880000
tm6	38	1.2216579	1.6230424	1.1885000	-3.3840000	4.3550000

Variable	N	Mean	Std Dev	Median	Minimum	Maximum
----------	---	------	---------	--------	---------	---------

Tabella 1 Medie di *Espressione del CEACAM*.

Come si può notare dalla figura 6.1 vi è una netta riduzione del CEACAM3 dopo l'intervento chirurgico, riduzione che rimane costante in I e V giornata per poi decrescere a sei mesi. Ciò è risultato statisticamente significativo  $P < 0.0003$ .

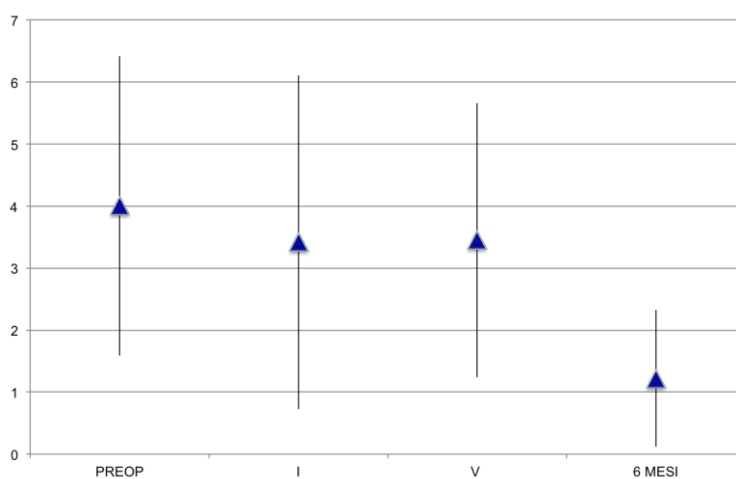


Figura 6.1 Andamento dell' *Espressione del CEACAM*.



L'espressione del CEACAM3 è stata valutata oltre che nelle diverse giornate del prelievo anche in rapporto alla sede della lesione (Figura 6.2), alla tecnica chirurgica utilizzata (Figura 6.3) ed allo stadio di malattia (Figura 6.4). Sia per quanto riguarda la sede che per quanto riguarda lo stadio si è osservato (assiste ad) un decremento dell'espressione del CEACAM3 a sei mesi dell'intervento chirurgico pressoché omogeneo. Discorso a parte merita l'analisi dell'espressione del CEACAM3 in rapporto alla tecnica chirurgica utilizzata. Diversamente a quanto succede in I e V giornata dall'intervento chirurgico dove l'espressione del CEACAM3 è più alta nei pazienti sottoposti ad intervento chirurgico tradizionale, il valore del marcatore a sei mesi mette in evidenza l'esatto opposto con valore maggiore nei pazienti operati per via laparoscopica.

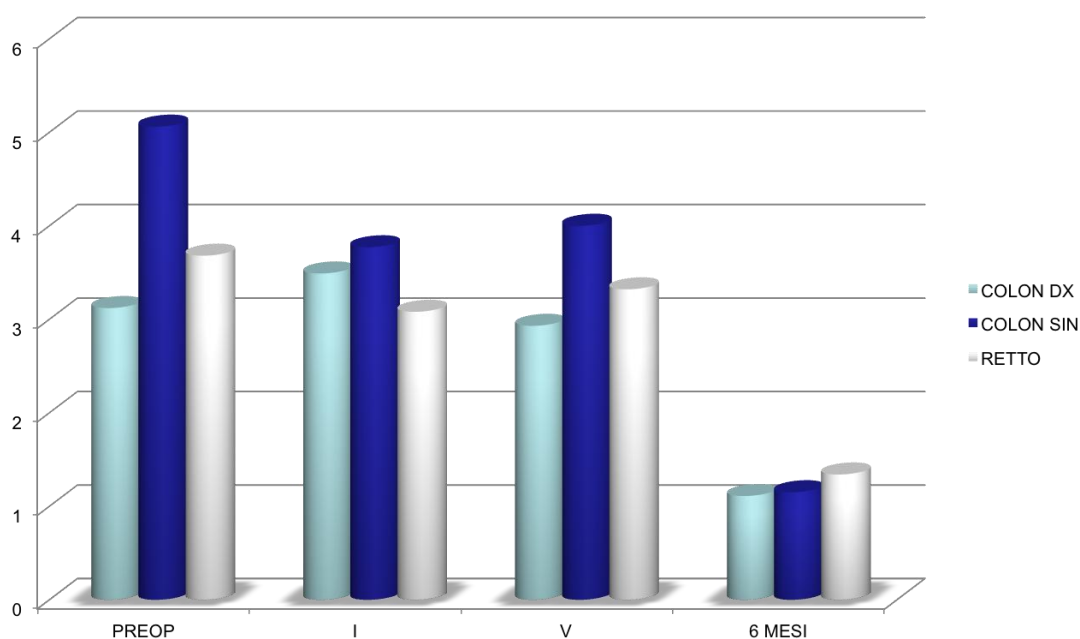


Figura 6.2 Andamento dell' *Espressione del CEACAM* in base alla sede della lesione.

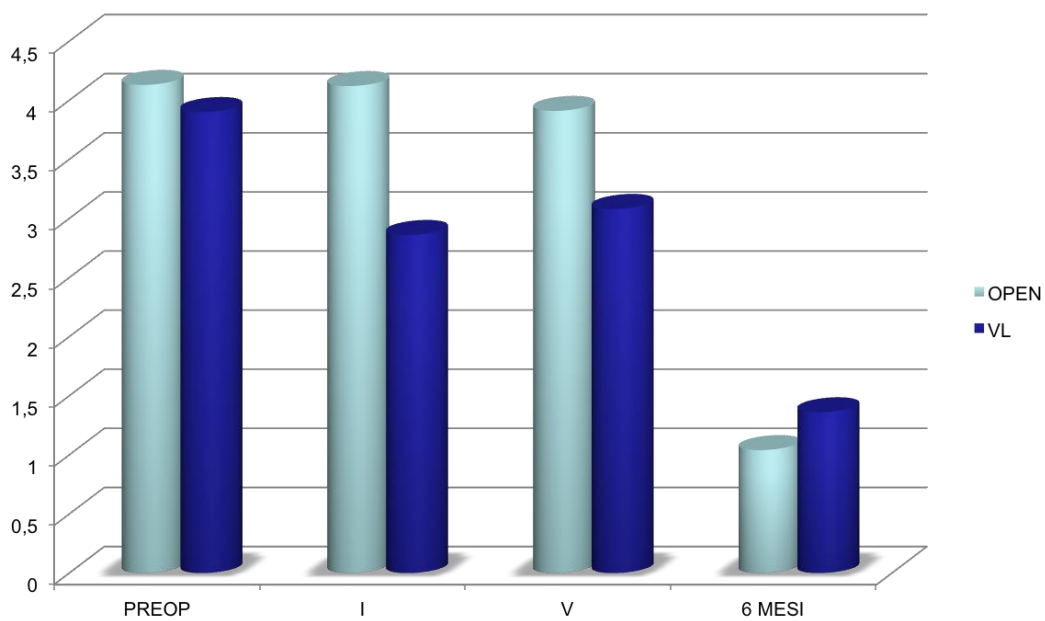


Figura 6.3 Andamento dell' *Espressione del CEACAM in base alla tecnica chirurgica utilizzata.*

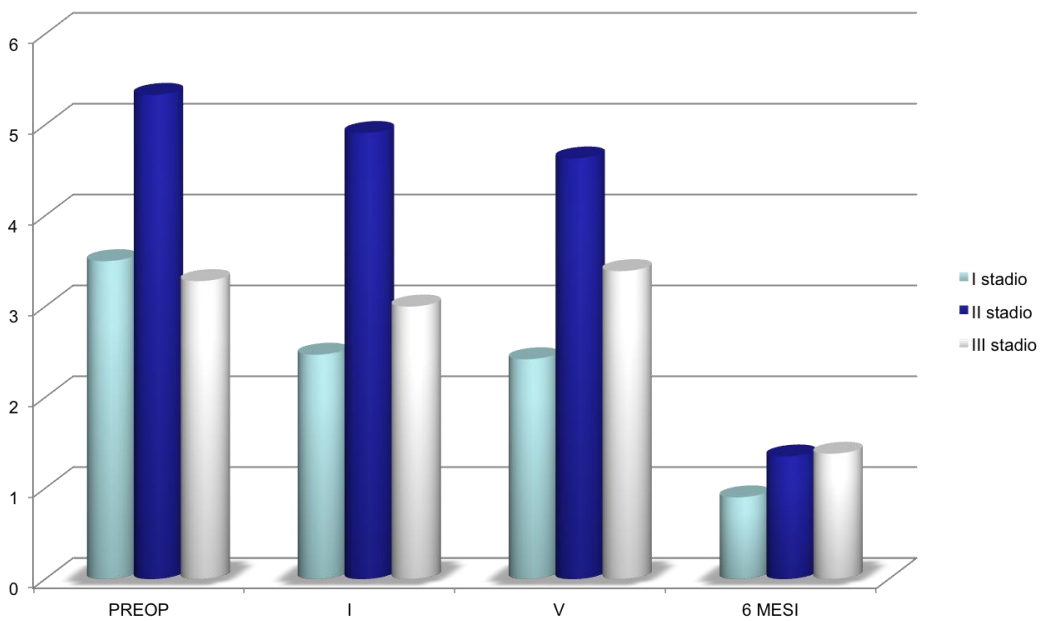


Figura 6.3 Andamento dell' *Espressione del CEACAM in base allo stadio di malattia.*

Discorso a parte merita l'analisi del CEACAM3 nei prelievi intraoperatori (Figura 6.4). Infatti l'espressione del marcatore risulta significativamente più bassa in questi prelievi ( $P < 0.005$ ) rispetto a quelli effettuati il giorno prima dell'intervento chirurgico in I e V giornata, ma più alti rispetto a quelli effettuati a sei mesi dallo stesso.

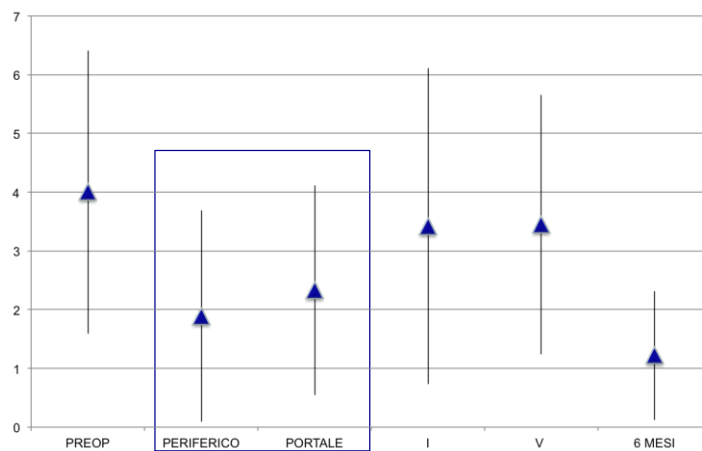


Figura 6.4 Andamento dell' *Espressione del CEACAM nei prelievi intraoperatori..*

## 7. DISCUSSIONE

Il cancro del colon - retto è, nei paesi occidentali, la quarta neoplasia più frequente per incidenza e la terza più frequente causa di morte per neoplasia, con una sopravvivenza globale a cinque anni che si aggira intorno al 60 %, nonostante i notevoli miglioramenti tecnologici e la maggiore efficacia delle terapie adiuvanti<sup>lii</sup>.

Purtroppo, a causa della non specifica e tardiva sintomatologia, spesso la diagnosi viene fatta quando il tumore si trova già in uno stadio avanzato.

Lo stadio patologico rappresenta il più importante fattore prognostico per questa neoplasia e due sono i sistemi stadiativi più comunemente usati. Il primo ed il più "vecchio" è rappresentato dalla classificazione di Dukes che, pur risalendo al 1932, è ancora largamente usata nonostante limiti evidenti anche dopo le successive modifiche apportate nel tentativo di raggiungere la massima accuratezza possibile.

Infatti, sia all'interno dello stadio A che dello stadio C, due stadi peraltro con prognosi molto diversa, si possono identificare circa un 20 - 25 % di pazienti con differente prognosi rispetto a quella del gruppo di appartenenza<sup>liii</sup>. Lo stadio B, inoltre, racchiude al suo interno un numero troppo ampio di pazienti con notevoli disomogeneità in termini di tipo di trattamento ricevuto, di risposta terapeutica e di sopravvivenza.

Il secondo sistema stadiativo è rappresentato dal *tumor-node-metastasis* (TNM), così come è stato definito, e periodicamente aggiornato, dalla Società Americana di Studio sul Cancro (AJCC). Esso è, attualmente, il sistema stadiativo più utilizzato e meno discusso per la stratificazione prognostica, anche se il parametro N è, forse, ancora troppo poco caratterizzato e caratterizzante rispetto alle odierne esigenze stadiativo - terapeutiche.

Per questo motivo è nata da tempo la necessità di approfondire lo studio e la

comprensione dei meccanismi che portano alla trasformazione neoplastica, alla perdita del controllo della proliferazione, all'acquisizione della capacità di dare metastasi a distanza, con la convinzione che questi dati possano fornire elementi utili per caratterizzare meglio l'andamento prognostico nei vari stadi e poter personalizzare in maniera più adeguata il trattamento terapeutico di ogni singolo paziente, passando attraverso una più accurata stadiazione.

Sappiamo che il processo di metastatizzazione comincia spesso nelle fasi più precoci dello sviluppo del tumore e può rimanere misconosciuto al momento della diagnosi del tumore primitivo, nonostante l'ausilio delle moderne tecniche di imaging. E' evidente ed ampiamente dimostrato, quindi, come la semplice rimozione del tumore primitivo non possa essere considerata come l'unico obiettivo lungo la strada da percorrere verso la guarigione dalla neoplasia e, quindi, verso l'assenza di malattia residua.

Esistono a tale proposito numerosi studi relativi all'identificazione delle micrometastasi linfonodali, in alcuni tumori solidi tra i quali la mammella, il melanoma ed altre neoplasie gastrointestinali, che hanno evidenziato come circa il 15% dei pazienti ritenuti N0 all'esame istologico convenzionale siano, al contrario, N+. Questo è possibile grazie all'identificazione con metodiche adeguate di piccoli aggregati di cellule tumorali (micrometastasi o isolate cellule tumorali), che presentano dimensioni tali da non essere rilevate con le metodiche diagnostiche routinarie. D'altra parte è pur noto come il tessuto tumorale primitivo rilasci nel sangue periferico circa  $1 \times 10^6$  cellule neoplastiche ogni giorno e, di queste, solamente lo 0,01% è capace di sopravvivere e generare una metastasi<sup>liv</sup>. La sola presenza cioè di CTC non sembra rappresentare una condizione sufficiente per lo sviluppo di una metastasi.

Sulla base di queste esperienze, recentemente l'attenzione dei ricercatori si è concentrata verso la ricerca e la valutazione delle cellule TUMORALI circolanti (CTC) nel sangue periferico allo scopo di identificare un loro possibile ruolo prognostico, cercando in tal modo di stratificare più accuratamente il rischio di recidiva e quantificare la risposta alla terapia.

Tuttavia, a causa dell'enorme variabilità dei risultati ed all'assente standardizzazione delle metodiche di analisi, gli studi più recenti non hanno ancora confermato la reale rilevanza clinica delle CTC (ricerca 'utilizzo di tali cellule). Le problematiche sono ancora molteplici e riguardano tutte le fasi dell'analisi delle CTC, a partire dalle difficoltà nella loro identificazione, quantificazione e caratterizzazione.

La differenziazione delle CTC da quelle non-neoplastiche nel torrente ematico rappresenta proprio la prima difficoltà. Non esistono, infatti, molecole specifiche che possano identificare con certezza le CTC. Esse presentano proprio per la loro natura un'espressione eterogenea di recettori per fattori di crescita, molecole di adesione, chinasi ed antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità, oltre ad una notevole variabilità di alterazioni genetiche. Pertanto, il riconoscimento della cellula tumorale si basa sulla ricerca di molteplici antigeni tessuto-specifici, come ad esempio, nel caso dei tumori solidi epiteliali, le citocheratine (proteine del citoscheletro)<sup>lv</sup>. Tale espediente non è comunque scevro da falsi negativi, in quanto le CTC, a causa della loro spesso scarsa differenziazione, possono anche non esprimere gli antigeni specifici del tessuto di origine.

Il secondo problema è costituito dalla difficoltà di identificare un valore soglia che permetta di confermare la presenza di CTC nel sangue periferico.

Cristofanili e coll. hanno svolto uno studio<sup>lvi</sup> prospettico analizzando i livelli di CTC di 177 donne con cancro metastatico alla mammella confrontandoli con quelli di 345 donne sane usando il metodo immunomediato, allo scopo di dimostrare una possibile correlazione tra la presenza di CTC e l'insorgenza di metastasi. Sono riusciti, inoltre, ad identificare un valore soglia indicativo di una peggior prognosi pari a 5 CTC per 7,5 ml di sangue periferico, sulla base dell'osservazione che circa il 50% delle donne con neoplasia metastatica superavano tale valore e la loro sopravvivenza si riduceva ulteriormente.

E' stato proprio a seguito dei promettenti risultati ottenuti per le neoplasie della mammella che le ricerche sono state allargate anche ad altre neoplasie solide,

quali ad esempio il cancro del colon-retto. Nel 2008 Sastre e coll.<sup>lvii</sup> hanno osservato come, all'interno di un gruppo di 97 pazienti affetti da cancro coloretale in stadio avanzato, il 30% presentava CTC circolanti nel sangue, evidenziate con tecnica immunomediata. Sastre ha notato, inoltre, come la positività per le CTC (stabilita arbitrariamente  $\geq 2$  CTC per ogni 7,5 ml di sangue periferico) fosse strettamente correlata con lo stadio di malattia (20% di positività nello stadio II, 24,1% nello stadio III e 60% nello stadio IV), ma non con la sede del tumore primario, con il grado di differenziazione della neoplasia e con i livelli sierici di marcatori neoplastici. Le CTC erano, quindi, presenti anche negli stadi non avanzati di malattia tumorale ed assenti nei volontari sani. Nella letteratura più recente non c'è presente accordo su quale sia la metodica migliore per la ricerca delle CTC nel sangue. Le principali tecniche di rilevamento delle CTC attualmente utilizzabili possono essere suddivise in dirette ed indirette<sup>lviii</sup> (tabella 7.1).

Metodi	Materiale analizzato	Bersaglio della ricerca
<i><u>Indiretti</u></i>		
- Molecolari	RNA	<i>Marker epiteliali PCR Real-Time</i>
	DNA	<i>Mutazioni genetiche FISH</i>
- Immunomediato	Proteine marcatori	<i>Anticorpi Gradiente di densità</i>
<i><u>Diretti</u></i>		
- Isolamento basato sulle caratteristiche fisiche e morfologiche	Cellule nel campione ematico	<i>Gradiente di densità Filtrazione Striscio di sangue</i>

Tab.7.1 Metodi di analisi della presenza di CTC nel sangue periferico.

Tra le tecniche dirette troviamo i metodi molecolare ed immunomediato, rispettivamente rappresentati dalla PCR e dall'uso di anticorpi monoclonali diretti contro antigeni tessuto-specifici. Sebbene entrambi presentino una certa difficoltà nel differenziare le cellule neoplastiche da quelle non-neoplastiche, la PCR resta, tra le due metodiche, quella più sensibile, riuscendo a distinguere

una cellula neoplastica tra  $2 \times 10^7$  cellule ematiche. Questa tecnica consente l'amplificazione di frammenti di RNA che codificano per determinati marker tessuto-specifici allo scopo di identificare la presenza delle cellule neoplastiche presenti nel torrente circolatorio. Ancora più recentemente, al fine di aumentare la sensibilità diagnostica, è stata introdotta la *quantitative Real-Time PCR* (qPCR), caratterizzata dalla capacità non solo di identificare ma anche di quantificare il numero dei trascritti per gli antigeni tessuto-specifici e stabilire, quindi, un cut-off di riferimento oltre il quale considerare la positività del test per la presenza di CTC.

Sulla base di tali premesse, abbiamo raccolto una casistica prospettica costituita da 38 pazienti, reclutati nel 2009 e sottoposti ad intervento chirurgico radicale per neoplasia del colon-retto. Una peculiarità della casistica consiste nel fatto che tutti gli interventi chirurgici sono stati eseguiti da un solo operatore al fine di ridurre al minimo l'influenza della variabilità legata alla tecnica ed all'esperienza chirurgica sull'andamento della prognosi. I risultati ottenuti sono stati poi confrontati con quelli di un gruppo di pazienti sani di riferimento. Per tale analisi, anche in relazione a quanto sopra detto, abbiamo optato per usare il metodo della PCR Real-Time. La casistica, se pur preliminare come obbiettivi e come numerosità, ci ha permesso di ottenere risultati che consentono le seguenti considerazioni.

Gli aspetti più strettamente legati alla prognosi saranno analizzati in una fase successiva dello studio, quando il follow-up avrà raggiunto una durata sufficiente per poter effettuare inferenze sulla sopravvivenza totale e libera di malattia.

Con la PCR Real-Time è stato possibile valutare, in modo indiretto, nel sangue dei pazienti con neoplasia del colon, la presenza delle cellule neoplastiche circolanti, andando a ricercare l'espressione di alcuni markers presenti sulla superficie delle cellule. La nostra scelta si è indirizzata sul CEACAM3 sia grazie ai risultati disponibili nella letteratura più recente sull'argomento, sia in virtù del fatto che questo marcatore risulta quello più ricercato per il tumore del



colon-retto. I risultati ottenuti sono stati poi confrontati con quelli ottenuti dal gruppo di pazienti sani di riferimento.

E' opportuno sottolineare come il CEA che viene comunemente dosato nel siero con la metodica ELISA, è costituito da un pool di antigeni dello stesso CEA o, per meglio dire, dalle subunità CEACAM 1, CEACAM 2, CEACAM 3. In poche parole, vengono dosate sia le subunità "parafisiologiche" CEACAM 1 e CEACAM 2, sia quella specifica di soggetti con neoplasia coloretta, CEACAM 3, e questo potrebbe spiegare la frequente presenza del marcatore nei soggetti non neoplastici. Il marcatore utilizzato da noi in PCR Real-Time è costituito invece dalla sola subunità CEACAM 3 e, pertanto, il suo dosaggio risulta specifico per le neoplasie coloretali.

Nella nostra casistica il CEACAM3 è risultato essere espresso in tutti i 38 pazienti analizzati rispetto alla popolazione sana di riferimento, nella quale non è stata evidenziata alcuna espressione. La presenza di tale marcatore permane anche se in maniera ridotta in I, V giornata dopo l'intervento chirurgico ed a sei mesi direttamente proporzionale allo stadio ed alla sede della lesione. Inoltre, nei pochi studi condotti con questa metodica l'espressione del CEA non viene interpretata quantitativamente, e quindi non esistono al momento valori di riferimento universalmente accettati ad i quali riferirsi.

Noi crediamo, tuttavia, che questa fluttuazione di espressione debba essere valutata non tanto come segnale di una variabile presenza numerica di cellule circolanti, bensì come indice di maggior o minor attivazione delle cellule tumorali presenti, che si manifesta con mutazioni nell'espressione di recettori di membrana e, quindi, indirettamente, della sintesi proteica.

Ulteriori considerazioni possono essere fatte analizzando i risultati dei prelievi in base alla tecnica chirurgica utilizzata.

Tale indagine è stata fatta allo scopo di valutare il possibile effetto dell'intervento chirurgico sulla presenza di cellule circolanti. L'analisi dei risultati ha messo in evidenza una presenza costante di cellule circolanti anche dopo l'intervento, evidenziata attraverso un'iperespressione del CEA che è

risultata maggiore a sei mesi nei pazienti sottoposti ad intervento chirurgico per via laparoscopica.

In particolare, è presumibile che l'iperespressione del CEA nel periodo post-operatorio possa essere ricondotta a fenomeni legati alla manipolazione chirurgica.

Alcuni studi presenti in letteratura, infatti, sembrano suggerire che le manovre chirurgiche possano essere causa della disseminazione delle cellule circolanti e quindi dello sviluppo di metastasi nei tumori gastrointestinali e, sempre a tale proposito, uno studio condotto da Demicheli e coll.<sup>lix</sup> nel 2007 dimostra come la chirurgia contribuisca ad interrompere la fase di quiescenza delle cellule circolanti in donne con tumore della mammella, determinando un aumento del rischio di recidiva a 5 anni.

In definitiva, dal nostro studio, che è assolutamente preliminare, possiamo concludere che al momento è possibile solo dimostrare la presenza delle cellule neoplastiche circolanti mentre non è ancora possibile una loro corretta quantizzazione, anche in considerazione della mancanza dei valori di riferimento. Inoltre, abbiamo dimostrato la presenza di cellule circolanti in tutti i pazienti con cancro del colon, sia prima che dopo l'intervento, mentre esse sono totalmente assenti nel gruppo di controllo. L'espressione del marcatore studiato è estremamente fluttuante e questo dato deve probabilmente essere interpretato come un indice dell'attivazione cellulare.

Tale variabilità, comunque, non deve essere intesa come puro potere oncogeno, ma come capacità delle cellule di mantenere attivo il recettore o di indurre l'espressione di un maggior numero di recettori per i markers presi da noi in esame.

Questi dati sono assolutamente preliminari, sia per l'esiguità del campione esaminato che per un troppo breve intervallo di tempo trascorso dall'intervento chirurgico. Un ulteriore prelievo a 6 mesi, per ora disponibile solo su 5 pazienti ed un follow-up più prolungato potrebbero darci più informazioni riguardo al potere metastatico delle CTC.

## 8. BIBLIOGRAFIA

---

- <sup>i</sup> Zaniboni A, Gennari L, Olmi P et al. *I tumori del tratto gastroenterico*. Masson (2003)
- <sup>ii</sup> Ponz De Leon M, Rossi G, di Gregorio C et al. *Epidemiology of colorectal cancer: the 21-year experience of a specialised registry*. Intern Emerg Med (2007); 2: 269-279
- <sup>iii</sup> Dionigi R. et al. *Chirurgia*. Masson (2003)
- <sup>iv</sup> Black RJ, Bray F, Ferlay J, Parkin DM *Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of National incidence for 1990*. Eur J Cancer (1997); 33:1075-1107
- <sup>v</sup> D. Max Parkin, MD, Freddie Bray; J. Ferlay, Paola Pisani, PhD *Global Cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin (2005); 55:74-108
- <sup>vi</sup> Nelson RL, Dollear T, Freels S et al. *The Relation of Age, Race, and Gender to the Subsite Location of Colorectal Carcinoma*. Cancer (1997); 80:193 - 7.
- <sup>vii</sup> Haenszel W, Kurihara M *Studies of Japanese migrants. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States*. J Natl Cancer Inst (1968); 40:43-68
- <sup>viii</sup> Pariente A, Milan C, Lafon J, Faivre J *Coloscopic screening in first-degree relatives of patients with 'sporadic' colorectal cancer: a case-control study*. The Association Nationale des Gastroenterologues des Hopitaux and Registre Bourguignon des cancer Digestifs (1998); 115:7-12
- <sup>ix</sup> Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID et al. *Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer*. N Engl J Med (2001); 345:638-646
- <sup>x</sup> Levi F, Lucchini F, Negri E, Boyle P et al. *Cancer mortality in Europe 1995-1999 and an overview of trends since 1960*. Int. J. Cancer (2004); 110: 155-169
- <sup>xi</sup> Mensink PB, Kolkman JJ, Van Baarlen J, Kleibeuker JH *Change in anatomic distribution and incidence of colorectal carcinoma over a period of 15 years: clinical consideration*. Dis Colon Rectum (2002); 45: 1393-1396
- <sup>xii</sup> Rabeneck L, Davila JA, El-Serag *Is there a true "shift" to the right colon in the incidence of colorectal cancer?*. Am J Gastroenterol (2003); 98:1400-1409
- <sup>xiii</sup> Giovannucci et al. *Tobacco, colorectal cancer and adenomas: a review of the incidence*. J Natl Cancer Inst (1998); 88:1717-1730
- <sup>xiv</sup> Giovannucci et al. *Aspirine use and risk of colorectal cancer in women*. New Engl Med (1995); 333:609-614
- <sup>xv</sup> Giovannucci et al. *Physical activity, obesity and risk of colorectal adenoma in women (United States)*. Cancer Causes Control (1996); 7:253-263
- <sup>xvi</sup> Slattery M et al. *Energy balance and colon cancer-beyond physical activity*. Cancer

---

Res (1997); 57:75-80

- <sup>xvii</sup> Colditz GA et al. *Physical activity, obesity, and reduced risk of colon cancer: implication for prevention.* Cancer Causes Control (1997); 8:649-667
- <sup>xviii</sup> Frezza EE, Wachtel MS, Chiriva-Internati M *Influence of obesity on the risk of developing colon cancer.* Gut (2006); 55:285-291
- <sup>xix</sup> Giovannucci E et al. *Modified risk factors for colon cancer.* Gastroenterol Clin N Am (2002); 31:925-943
- <sup>xx</sup> Michels KB et al. *Prospective study of fruit and vegetable consumption and incidence of colon and rectal cancer.* Journal of the National Cancer Institute (2000); 92:1740-1752
- <sup>xxi</sup> Giovannucci E et al. *Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurse's Health study.* Ann Intern Med (1998); 129:517-524
- <sup>xxii</sup> Giovannucci E. et al. *A prospective study of cigarette smoking and risk of colorectal adenoma and colorectal cancer in US men.* J Natl Cancer Inst (1994); 86:183-191
- <sup>xxiii</sup> Almasio PL, Alvaro D, Alvisi V et al. *Unigastro – Manuale di Gastroenterologia.* Editrice Gastroenterologica Italiana (2004)
- <sup>xxiv</sup> Strate LL et al. *Hereditary colorectal cancer syndrome* Cancer Causes and Control (2005); 16:201-213
- <sup>xxv</sup> Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, Godlee F, Stolar MH, Mulrow CD et al. *Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale.* Gastroenterology (1997); 112:594-642
- <sup>xxvi</sup> Cole TRP, Sleightholme HV *The role of clinical genetics in management.* BMJ (2000); 321:943-946
- <sup>xxvii</sup> Gonzalez EC, Roetzheim RG, Ferrante JM et al. *Predictor of Proximal vs Distal Colorectal Cancers.* Dis Colon Rectum (2001); 44:251-258
- <sup>xxviii</sup> Lynch BM, Baade P, Fritschi L, Leggett B et al. *Modes of presentation and pathways to diagnosis of colorectal cancer in Queensland.* MJA (2007); 186:288-291
- <sup>xxix</sup> Korsgaard M, Pedersen L, Sorensen HT, Laurberg S *Reported symptoms, diagnostic delay and stage of colorectal cancer: a population-based in Denmark.* Colorectal Disease (2006); 8:688-695
- <sup>xxx</sup> Thompson MR, Perera R, Senapati A, Dodds S *Predictive value of common symptom combinations in diagnosing colorectal cancer.* British Journal of Surgery (2007); 94:1260-1265
- <sup>xxxi</sup> Panzuto F, Chiriatti A, Bevilacqua S, Giovannetti P et al. *Symptom-based approach to colorectal cancer: survey of primary care physicians in Italy.* Digestive and Liver Disease (2003); 35: 869-875

- 
- xxxii Gollub MJ, Schwartz LH, Akhurst T et al. *Update on Colorectal Cancer Imaging*. Radiol Clin N Am 45 (2005); 85-118
- xxxiii Duffy MJ, van Dalen A, Haglund et al. *Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use*. Eur J Cancer (2007); 43:1348-60.
- xxxiv Mander BJ, Carney LJ, Scott HJ, Donaldson DR *Jass staging is a predictor of outcome following "curative" resection of Dukes' B colorectal carcinoma*. Surgeon 4 (2006); 4:227-230
- xxxv Haslam AC, Pearson JM, Bisset DL et al. *A Dukes/Jass combination – is it more discriminating?* Colorectal Disease (2006); 8:418-422
- xxxvi Smalley WE et al. *Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. Adv Pharmacol (1997); 39:1-20
- xxxvii Walsh JM, Terdiman JP *Colorectal cancer Screening*. JAMA (2003); 289:1288-1296
- xxxviii Allison JE, Sakoda LC, Levin TR et al. *Screening for Colorectal Neoplasm with new Fecal Occult blood test: update on performance characteristics*. J Natl Cancer Inst (2007); 99:1462-70
- xxxix Kavanagh AM, Giovannucci EL et al. *Screening endoscopy and risk of colorectal cancer in United States men*. Cancer and Control (1998); 9:455-461
- xl McFarland EG, Levin B, Lieberman AD et al. *Revised Colorectal screening Guidelines*. Radiology (2008); 248:717-720
- xli Ponz de Leon M, Benatti P, Di Gregorio G et al. *Staging and survival of colorectal cancer: are we making progress?* Digestive Liver Dis (2000); 32:312-17
- xlii Gervaz P, Bouzourene H et al. *Dukes B Colorectal cancer*. Dis Colon Rectum (2001); 44:364-373
- xliii Sternberg A, Sibirsky O, Cohen D et al. *Validation of a new classification system for curatively resected colorectal Adenocarcinoma*. Cancer(1999); 86:782-92
- xliv Caricato M., Borzomati D., Ausania F., Valeri S., Rosignoli A., Coppola R., *Prognostic factors after surgery for locally recurrent rectal cancer: an overview*, J Canc Surg (2006); 32:126-32
- xlv Raab R, Meyer HJ, Werner U. *Surgery for rectal cancer*. In Bleiberg H, Kemeny N, Rougier P, Wilke HJ (Eds). *Colorectal cancer. A clinical guide to therapy* Martin Dunitz, London (2002)
- xlvi Minsky B. D., Mies C., Recht A., et al. *Resectable adenocarcinoma of the rectosigmoid and rectum. 1. Patterns of recurrence following curative and survival* Cancer (1988); 61: 1408-1416

- 
- xlvii Jeffrey A, Meyerhardt M.D., M.P.H, And Robert J Mayer M.D. *Systemic therapy for colorectal cancer* N Engl J Med (2005)
- xlviii Mayer A, Takimoto M, Fritz E, Schellander G, Kofler K, Ludwig H *The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdr gene expression in colorectal cancer* Cancer 1993;71:2454-60
- xliv Kabbinavar F, Hurwitz H, Fehrenbacher L, et al. *Phase II, randomized trial comparing bevacituzimab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patient with metastatic colorectal cancer* J Clin Oncol (2003);21:60-5
- l Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. *Bevacituzimab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer* N Engl J Med (2004);350:2335-42
- li Berlin JD *Targeting vascular endothelial growth factor in colorectal cancer* Oncology (2002)
- lii Wolpin B.M., Meyerhardt J.A., Mamon H.J., Mayer R.J., *Adjuvant treatment of colorectal cancer* CA: A cancer journal for clinicians, (2007); 57(3):168-85
- liii Hriesik C., Ramanathan R.K., Hughes S.J., *Update for surgeons: Recent and noteworthy changes in therapeutic regimens for cancer of the colon and rectum* (2007); 205(3): 468-78
- liv Paterlini-Brechot P, Benali NL *Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future direction.* Cancer Letters (2007); 253:180-204
- lv Riethdorf S, Wikeman H, Pantel K *Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients.* Int J Cancer (2008); 123:1991-2006
- lvi Cristofanili M, Budd GT, Ellis MJ et al. *Circulating tumor cells, disease progression and survival in metastatic breast cancer.* New Engl J Med (2004); 351:781-91
- lvii Sastre J, Maestro ML, Puente J et al. *Circulating tumor cells in colorectal cancer: correlation with clinical and pathological variables.* Annals of Oncology (2008) 19:935-938
- lviii Di Costanzo F, Pinzani P, Orlando C et al. *Circulating tumor cells in colorectal cancer.* EJC Supplements (2008)
- lix Demicheli R, Retsky MW, Hrushesky WJ et al. *Tumor dormancy and surgery-driven interruption of dormancy in breast cancer: learning from failures.* Nature Clin Pract Oncol (2007); 4:699-710