

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale

Dottorato di Ricerca in Oncologia, Ematologia e Patologia

31 Ciclo

Settore concorsuale: 06/D3

Settore Scientifico disciplinare: MED/06 ONCOLOGIA MEDICA

TITOLO TESI

“Validazione di un profilo biomolecolare e mutazionale in pazienti affetti da tumore del retto localmente avanzato candidati a trattamento multimodale”

Presentata da: Dott.ssa Daniela Adua

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof.re Pierluigi Lollini

Prof.re Andrea Ardizzoni

Esame finale anno 2019

a Marco, Margherita e Tommaso
per trasformare ogni giorno della mia vita in una straordinaria avventura

a tutte le persone che mi hanno insegnato qualcosa

ai miei genitori, per esserci sempre

INDICE

Abstract

Introduzione al progetto di ricerca

1. EPIDEMIOLOGIA DEL TUMORE DEL RETTO

2. STADIAZIONE

2.1. Stadiazione clinica e radiologica

2.1.a Stadiazione locale

2.1.b Timing della ristadiazione post trattamento neo-adiuvante

3. TRATTAMENTO NEO-ADIUVANTE DEL TUMORE DEL RETTO LOCALMENTE AVANZATO (LARC)

3.1. La tecnica, il timing e la modalità di radioterapia neo-adiuvante

3.2. L'impatto della chemioterapia concomitante neo-adiuvante

4. LA CHIRURGIA NEL TRATTAMENTO DEL TUMORE DEL RETTO LOCALMENTE AVANZATO

5. STADIAZIONE ANATOMO-PATOLOGICA

5.1 VIII versione TNM-UICC 2016 /VII edizione AJCC 2018

6. TRATTAMENTO CHEMIOTERAPICO ADIUVANTE

6.1 Possibili scenari futuri

7. FATTORI PROGNOSTICI E PREDITTIVI NEL TUMORE DEL RETTO LOCALMENTE AVANZATO

7.1 Timidilato Sintetasi

7.1.a Valore prognostico e predittivo di TS nel tumore del retto: revisione della letteratura

7.2 Proteina P53

7.2.a Valore prognostico e predittivo di P53 nel tumore del retto: revisione della letteratura

7.3 Ki-67

7.3.a Valore prognostico e predittivo di Ki-67 nel tumore del retto: revisione della letteratura

7.4 Recettore del Fattore di Crescita Epidermico (EGFR)

7.4.a Valore prognostico e predittivo di EGFR nel tumore del retto: revisione della letteratura

7.5 Bcl-2

7.5.a Valore prognostico e predittivo di Bcl-2 nel tumore del retto: revisione della letteratura

7.6 Instabilità Microsatellitare

7.6.a Valore prognostico e predittivo di MSI nel tumore del retto: revisione della letteratura

8. IL PROGETTO DI RICERCA, LA SUA REALIZZAZIONE, I RISULTATI OTTENUTI

- 8.1. Materiali e metodi
 - 8.1.a Caratteristiche dei pazienti
- 8.2. Analisi immunoistochimiche
- 8.3. Analisi statistica
- 8.4. Risultati dell'analisi statistica
- 8.5. Conclusioni

9. BIBLIOGRAFIA

10. APPENDICE: Grafici, Tabelle esplicative, Tabelle analisi dati software SPSS

Abstract progetto di ricerca “Validazione di un profilo biomolecolare e mutazionale in pazienti affetti da tumore del retto localmente avanzato candidati a trattamento multimodale”.

Introduzione. Il carcinoma del retto localmente avanzato (LARC) comprende gli stadi II e III, (cT3-T4 N-/+ M0), il cui trattamento standard è un approccio combinato neo-adiuvante chemio-radioterapico, seguito dopo 6-8 settimane da chirurgia con tecnica di Total Mesorectal Excision e chemioterapia adiuvante.

Rappresenta circa il 25% di tutti i tumori del colon-retto, con rischio di recidiva del 5-10% se la neoplasia viene diagnosticata allo stadio I, 25-30% nello stadio II, fino al 50% nello stadio III. La sopravvivenza globale a 5 anni segue un andamento simile e strettamente dipendente dall'interessamento linfonodale: 85% stadio I-II, 55% stadio III, meno del 3% nello stadio IV. I fattori prognostici e predittivi del LARC possono essere distinti in clinici, anatomo-patologici e biomolecolari. Questi ultimi non hanno ancora oggi un ruolo prognostico e predittivo validato. Ciò si giustifica in parte per le numerose piccole casistiche presenti in letteratura, dove la disomogeneità del campione, dei trattamenti prescritti e delle tecniche immuno-istologiche non consentono di arrivare ad una validazione internazionale. Dati interessanti e più facilmente verificabili in futuri studi clinici prevedono la realizzazione di score clinico-molecolari e la creazione di gene expression profiling specifico per il LARC.

Materiali e metodi. Il nostro progetto di ricerca si è posto di indagare il valore prognostico e predittivo di fattori biomolecolari espressi nella neoplasia alla diagnosi ed ottenuti mediante biopsia tissutale, quali EGFR, timidilato sintetasi (TS), proteina p53, indice di proliferazione Ki-67, proteina Bcl-2, instabilità microsatellitare (MSI), su una casistica retrospettiva di 149 pazienti con follow-up mediano di 71.5 mesi (range 2-181 mesi, last update marzo 2018). Inoltre, tutt'ora in corso, la definizione di gene expression profiling nel setting specifico di pazienti affetti da LARC con risposta patologica completa dopo trattamento multimodale, avendo come gruppo controllo una casistica con scarsa risposta al trattamento.

Risultati. Dall'analisi statistica non sono emerse associazioni significative tra espressione dei fattori biomolecolari rispetto agli indici predittivi e prognostici di risposta esaminati quali la risposta patologica completa (pCR), tempo libero di ripresa di malattia (DFS), sopravvivenza globale (OS).

Conclusioni. Non è stato pertanto possibile perseguire l'obiettivo iniziale che prevedeva la creazione di un nomogramma predittivo di risposta al trattamento radio chemioterapico. Sono state confermate numerose associazioni e correlazioni statistiche e la loro ricaduta clinica, come lo stadio alla diagnosi, lo stadio patologico, lo stato del margine circonfenziale, il grado di regressione tumorale, l'entità della risposta patologica completa, a conferma di un'adeguata gestione multidisciplinare dei casi trattati.

INTRODUZIONE AL PROGETTO DI RICERCA: “Validazione di un profilo biomolecolare e mutazionale in pazienti affetti da tumore del retto localmente avanzato candidati a trattamento multimodale”

Il carcinoma del retto medio-basso localmente avanzato (cT3-T4 o N+) si distingue dal carcinoma del retto alto e del colon per sede anatomica, evoluzione ed approccio terapeutico, costituendo così un'entità clinica distinta dove il management multidisciplinare impatta in maniera statisticamente significativa sull'outcome clinico ed oncologico, tanto da essere prerogativa delle linee guida Aiom 2017 e dei più innovativi percorsi diagnostico-terapeutici assistenziali regionali. Una recente analisi retrospettiva condotta su 23.464 casi trattati negli Stati Uniti ha evidenziato come la mancata discussione multidisciplinare fosse uno degli elementi predittivi di positività del margine chirurgico circonfenziale, stadio avanzato e mancato trattamento radioterapico.

Una corretta e standardizzata gestione ha consentito di ottenere un incremento del tempo libero da ripresa di malattia (DFS) pari al 94% nello stadio I a 5 anni e fino all'80% negli stadi II del retto ultra basso e negli stadi III.

Questo importante traguardo si grava però di tossicità gastrointestinali, genito-urinarie e di un complessivo peggioramento della qualità di vita relazionale e sessuale dei nostri pazienti.

Numerosi sono gli scenari clinici con differenti caratteristiche prognostiche, tali da rendere consistente il rischio di overtreatment. La reale efficacia della chemioterapia adiuvante è supportata principalmente da estrapolazioni di dati di studi inerenti il carcinoma del colon in pazienti con chiara positività linfonodale alla stadiazione clinica iniziale e/o alla stadiazione patologica e nei pazienti con scarsa risposta al trattamento chemioradioterapico preoperatorio.

E' assolutamente dibattuto il suo ruolo nei pazienti che ottengono una risposta patologica completa o in assenza di interessamento linfonodale iniziale.

L'uso di nomogrammi potrebbe favorire sia la predizione della risposta al trattamento neo-adiuvante che la quantificazione del beneficio della chemioterapia adiuvante.

E' in questo scenario che si colloca la nostra analisi retrospettiva condotta su una casistica di 149 pazienti con l'obiettivo di valutare il ruolo prognostico e predittivo di alcuni indicatori bio-patologici (timidilato sintetasi, proteina p53, EGFR, indice di proliferazione Ki-67, proteina Bcl-2, instabilità microsatellitare) espressi nella neoplasia alla diagnosi, con la finalità di personalizzare la strategia terapeutica e il follow-up.

1. EPIDEMIOLOGIA

Il tumore del colon-retto è in assoluto il più frequente considerando entrambi i sessi (13% dei nuovi tumori diagnosticati all'anno). È la seconda causa di morte oncologica in tutte le fasce di età (11% del totale dei decessi per tumore registrati in Italia nelle 2013, pari a 19.000 eventi). Rappresenta la terza neoplasia più frequente negli uomini preceduto da prostata e polmone, mentre la seconda nelle donne dopo il tumore della mammella.

I dati Istat indicano per il 2013 circa 18.800 decessi attribuibili al tumore del colon-retto, di questi il 30% può essere ricondotto ad una localizzazione rettale.

L'incidenza è minore nelle donne e geograficamente risulta maggiore nelle regioni centrali.

Fino al 2007 si è assistito ad un aumento dell'incidenza in entrambi i sessi seguito da una riduzione secondaria ai programmi di screening regionali con conseguente calo della mortalità, stimato del 2% annuo in entrambi i sessi.

La prognosi è fortemente correlata allo stadio iniziale e alla gestione multidisciplinare del caso. Complessivamente, come sottolineato dalle linee guida Aiom 2017, la sopravvivenza a cinque anni è aumentata dal 47% degli anni 90 al 63% per i soggetti con diagnosi posta a metà degli anni 2000. Come riportato dalla revisione condotta da Airtum dal 2000 al 2007 e illustrata nella tabella sottostante, la sopravvivenza dei pazienti oncologici a 5 anni dalla diagnosi in Italia (nelle aree coperte dai Registri tumori AIRTUM), è allineata alla media europea per tutte le neoplasie analizzate. Inoltre, per molte sedi tumorali, tra cui stomaco, colon, retto, polmone, melanoma cutaneo, mammella femminile, prostata, rene e linfomi non Hodgkin, i valori relativi ai pazienti italiani son superiori alla media europea.

	 ITALIA	 EUROPA	 ITALIA vs. EUROPA	 NORD EUROPA	 ITALIA vs. NORD EUROPA
SEDE	SR (%)	SR (%)		SR (%)	
Stomaco	32	25	↑	22	↑
Colon	61	57	↑	59	↑
Retto	58	56	↑	60	=
Polmone	14	13	↑	12	↑
Melanoma cutaneo	85	83	↑	88	↓
Mammella femminile	86	82	↑	85	=
Ovaio	38	38	=	41	↓
Prostata	89	83	↑	85	↑
Rene	67	61	↑	56	↑
Linfomi non Hodgkin	62	59	↑	63	↓

2. STADIAZIONE

2.1 STADIAZIONE CLINICA E RADIOLOGICA

Il primo approccio diagnostico nei pazienti con tumore del retto è l'esame clinico completo di esplorazione rettale, per valutare, seppure in maniera approssimativa essendo valido solo per le neoplasie del retto medio-basso, alcuni importanti parametri quali: distanza dal margine anale esterno, versante interessato, volume, grado di fissità del tumore, stato sfinteriale, presenza di sanguinamento.

A questo seguirà un workup diagnostico completo di: rettosigmoidocolonscopia, RM pelvi senza mdc preferibilmente con tecnica DWI, TC torace-addome con mdc.

Negli stadi iniziali è bene eseguire anche un' ecografia endorettale per una migliore visualizzazione del tumore primitivo (T), valutando specificatamente l'infiltrazione della sottomucosa e della tonaca muscolare. Nei casi dubbi, qualora la TC fosse sospetta per localizzazioni linfonodali extraregionali e/o secondarismi può trovare indicazione la PET 18 FDG di approfondimento.

2.1.a STADIAZIONE LOCALE

Le scelte terapeutiche presuppongono l'acquisizione di dati precisi sulla distanza della neoformazione dal margine anale, l'interessamento linfonodale locoregionale, la localizzazione intra o extra peritoneale, l'assenza di metastasi.

Il rettoscopio rigido consente di valutare con più precisione la distanza tra il margine inferiore del tumore e il margine anale esterno, mentre nella distinzione tra retto extra peritoneale e intraperitoneale è preferibile fare riferimento alle immagini RM con la corretta visualizzazione delle tre valvole di Huston. Rimane oggetto di discussione quale sia la distanza dall'ano che in rettoscopia rigida distingue il retto extra peritoneale da quello intraperitoneale.

Si tende ad utilizzare un cut-off centimetrico tra 1 e 12 cm, sebbene sia approssimativo.

La distinzione ha un'importante valenza terapeutica in quanto i pazienti con carcinoma del retto intraperitoneale seguono i protocolli esistenti per il cancro del colon.

Infatti in relazione alla maggior presenza di tessuto adiposo mesorettale che circonda il retto alto, alla presenza di peritoneo che avvolge il retto intraperitoneale e limita in parte la disseminazione locale della neoplasia, si giustifica un tasso più alto di recidiva pari al 14% del retto basso rispetto all'8% del retto medio e 3% per il retto alto.

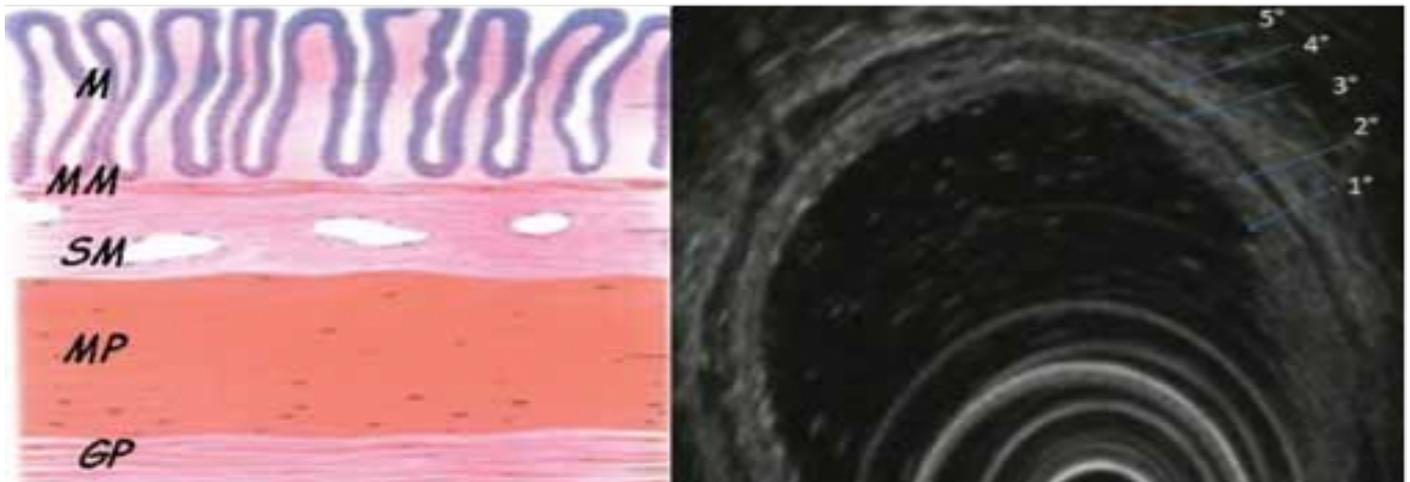
L'ecografia endorettale (EUS) si è dimostrata uno strumento rapido, sicuro ed accurato della stadiazione del tumore del retto. Questa metodica non è di semplice esecuzione e potrebbe essere di difficile interpretazione a causa del materiale fecale eventualmente presente in ampolla rettale, di lesioni mobili e di grandi dimensioni per cui richiede una learning curve ed operatori esperti. È possibile visualizzare accuratamente i piani della parete rettale, il grado di infiltrazione del tumore attraverso la parete e l'interessamento di linfonodi perirettali.

Con questa metodica la parete rettale appare formata da cinque piani ipo/iperecogeni che si alternano come risultato di una diversa impedenza acustica: il primo piano iperecogeno è l'interfaccia tra la mucosa della sonda, il secondo piano ipoecogeno rappresenta la mucosa e la muscolaris mucosae, il terzo piano iperecogeno è la sottomucosa, il quarto piano iperecogeno è la muscolaris mucosae, il quinto piano iperecogeno è l'interfaccia fra la sierosa e il grasso perirettale. Il tumore presenta un aspetto ipoecogeno.

La stadiazione ecoendoscopica del tumore presenta il prefisso "u", avremo così il corrispondente stadio uTN: uT1 la neoplasia non raggiunge la muscolaris propria, uT2 interessa la muscolaris propria, uT3 oltrepassa la muscolaris propria ed infiltra il grasso perirettale, uT4 infiltra le strutture adiacenti. (vedi figura n.1). La valutazione dello stato linfonodale prevede la visualizzazione di dimensioni, ecogenicità, forme e bordi, considerando il diametro massimo > 9 mm come suggestivo di interessamento metastatico. L'accuratezza varia nei diversi stadi, una sovrastadiazione è più frequente di una sottostadiazione. La causa più comune è una sovrastadiazione dello stadio T2. Il trattamento preoperatorio con radio-chemioterapia è un'altra causa di ridotta accuratezza: Napoleon et al (1) hanno dimostrato una riduzione dell'accuratezza nella stadiazione del T dall' 86% nei pazienti sottoposti direttamente a chirurgia al 46% dopo chemio radioterapia preoperatoria. La sovrastadiazione è causata principalmente dai cambiamenti indotti dal trattamento come la comparsa di reazione infiammatoria e fibrosi che si manifestano con aree ipoecogene e possono essere scambiate con il tumore.

L'accuratezza nella stadiazione dei linfonodi risulta ridotta. La sovrastadiazione può essere legata alla presenza di linfonodi reattivi che vengono considerati maligni oppure alla presenza di piccoli vasi sanguigni, uretra o vescichette seminali che vengono confusi con linfonodi metastatici. La sottostadiazione è invece legata alla difficoltà di individuare un iniziale interessamento metastatico di linfonodi estremamente piccoli e all'impossibilità di valutare linfonodi extraregionali. Le limitazioni dell'EUS sono quindi: operatore dipendenza, non poter essere eseguita in presenza di lesioni stenotiche, non essere in grado di valutare le strutture al di fuori del campo della sonda (linfonodi e fascia mesorettale).

Figura n. 1: corrispondenza tra istologia della parete e aspetto all'EUS



M - mucosa

MM - muscularis mucosae

SM - sottomucosa

MP - muscularis propria

GP - grasso periviscerale

1° strato iperecoico: interfaccia fra mucosa e lume del viscere

2° strato ipoecoico: mucosa profonda

3° strato iperecoico: sottomucosa

4° strato ipoecoico: muscularis propria

5° strato iperecoico: interfaccia fra parete e grasso perirettale

Risulta pertanto fondamentale l'integrazione con i dati provenienti dalla risonanza magnetica.

La risonanza magnetica risulta l'esame cardine nella stadiazione locale e nella successiva definizione del programma terapeutico, potendo individuare l'estensione locale, il margine circonfenziale (CRM), l'invasione vascolare extra murale.

Lo studio del retto viene eseguito con immagini T2 pesate che consentono di distinguere tre strati della parete rettale che dall'interno all'esterno sono costituiti da: uno strato di tipo intenso che corrisponde alla mucosa e muscularis mucosae, uno strato iper intenso che corrisponde alla sottomucosa, uno strato ipointenso che corrisponde alla muscularis propria.

Il grasso peri rettale presenta un'elevata intensità di segnale, in netto contrasto rispetto all'ipointensità della muscolare propria. Il tessuto neoplastico presenta intensità di segnale medio bassa e comunque superiore rispetto a quello della tonaca muscolare.

Lo studio prospettico osservazionale MERCURY (Magnetic Resonance Imaging in Rectal Cancer European Equivalence Study) condotto dalla radiologa inglese Gina Brown coinvolgendo 11 centri inglesi, pubblicato nel 2006 e con recente aggiornamento del follow-up, ha valutato l'accuratezza diagnostica della RM preoperatoria in una serie consecutiva di 679 pazienti con cancro del retto sottoposti a chirurgia con TME (Total mesorectal Excision). In questa casistica la risonanza

magnetica della pelvi si è dimostrata efficace nel predire il coinvolgimento del margine circonfrenziale con valore predittivo negativo del 94%. Lo studio ha dimostrato su 374 pazienti con carcinoma del retto che la positività del margine circonfrenziale (ovvero la presenza di neoplasia a meno di 1 mm dal CRM) segnalata in RM pre-operatoria (dopo radio chemioterapia neo-adiuvante o prima della chirurgia upfront) sia strettamente correlato con la sopravvivenza a cinque anni (62.2% nei CRM- vs 42.2% nei CRM+), con la DFS a 5 anni (67.2% nei CRM- vs 47.3% nei CRM+) e con la recidiva locale (3.5 volte più frequente nei CRM+). Lo studio ha concluso che la RM della pelvi nel cancro del retto è una metodica precisa, fattibile, riproducibile e che rappresenta lo standard per la stadiazione preoperatoria. Inoltre ha dimostrato che la valutazione del CRM in RM ha un valore prognostico su OS, DFS recidiva locale superiore al TNM-AJCC (2). In una meta-analisi di 32 studi e 1556 pazienti condotta da Van der Praardt et al (3) è stata verificata la maggiore accuratezza delle sequenze RM tradizionali associate a quelle in diffusione nella valutazione dello stadio yT rispetto alle sole sequenze RM tradizionali (94.2% vs 83.6%). Inoltre si segnala una maggior sensibilità e un miglior rapporto di probabilità negativa se gli operatori sono esperti con più di cinque anni di esperienza ($p=0,01$ e $p=0.03$).

Le attuali linee guida della Società Europea di Radiologia Addominale e gastrointestinale ESGAR (4) hanno inserito come fortemente consigliata l'esecuzione almeno una RM con sequenze in diffusione nell'ambito della stadiazione pre-operatoria. Le sequenze in diffusione aiutano a differenziare la fibrosi/infiammazione del residuo neoplastico ed hanno elevata specificità nell'evidenziare il residuo neoplastico come tessuto iper intenso ad elevata cellularità e quindi definire lo stadio yT. La differenza nell'intensità di segnale nel pre e post trattamento radio chemioterapico è un fattore determinante nella valutazione della risposta. Seppur necessaria un'elevata competenza specialistica esistono dei parametri univoci per la refertazione che permettono alle clinico di valutare l'andamento della malattia (5-6). Il criterio dimensionale consigliato nella ristadiazione come cut-off per considerare i linfonodi residui neoplastici è pari a > 5 mm.

Particolare attenzione deve essere posta nel definire il T3, in RM infatti si suddividono 3 sottogruppi:

- T3a, T3b o T3 iniziale con infiltrazione extraparietale $<$ o uguale ai 5 mm
- T3c, T3d o T3 avanzato con infiltrazione extraparietale $>$ 5 mm, infiltrazione della fascia mesoretale (MRF) o coinvolgimento del CRM se la distanza tra la neoplasia e la MRF è $<$ 1 mm.

Secondo quanto sottolineato dalle recenti Linee guida ESMO 2017 (7) ciò può comportare un atteggiamento terapeutico diverso (radio-chemioterapia neoadiuvante vs chirurgia con TME up-

front negli stadi cT3 iniziali). La distanza tra neoplasia e la MRF > 2 mm definisce l'assenza di infiltrazione, mentre l'infiltrazione delle peritoneo definisce lo stadio T4a, quella di altri organi strutture lo stadio T4b.

La RM inoltre nei tumori del retto basso fornisce i rapporti che la neoplasia contrae con l'apparato sfinteriale, riconoscendo l'infiltrazione dello sfintere anale esterno, del piano intersfinteriale e dei muscoli elevatore dell'ano, aiutando nella previsione della manovra chirurgica. Dovrebbe essere considerato anche l'esame standard per descrivere l'infiltrazione macroscopica peri vascolare (EMVI). In una meta-analisi recentemente pubblicata da Chan et al è stato verificato il valore prognostico negativo dell'EMVI con sopravvivenza a cinque anni del 39.5%, sottolineando l'importanza di segnalare la presenza di eventuale EMVI nel referto. È stata inoltre verificata all'accuratezza superiore della RM rispetto all'esame istologico nell'evidenziare l'EMVI macroscopica perivascolare (8).

Pertanto se l'ecoendoscopia dovrebbe essere considerato l'esame standard per stadiare le neoplasie in stadio iniziale (cT1-T2), la RM dovrebbe essere l'esame standard per stadiare le neoplasie localmente avanzate (cT3-T4 o N+) in quanto estremamente precisa nel valutare l'invasione del mesoretto, l'infiltrazione della fascia perirettale, l'invasione delle grasso peri rettale, degli organi e delle strutture continue, il rapporto con gli apparati sfinteriali e l'infiltrazione macroscopica perivascolare.

Tutte le metodiche di imaging risultano oggi ancora poco accurate nella definizione dello stadio N. Infatti è assolutamente dibattuto il cut-off dimensionale per definire un linfonodo metastatico, seppure il peso prognostico e predittivo di un coinvolgimento linfonodale alla diagnosi sia tale da influenzare l'intero trattamento multidisciplinare.

Nella stadiazione di N in RM è raccomandato l'uso di criteri morfologici per la valutazione dei linfonodi del mesoretto, stazioni laterali e mesorettali, seppure questi siano applicabili solo per linfonodi > 3 mm. I criteri comprendono: morfologia rotondeggiante, contorni irregolari, intensità di segnale disomogenea. In una meta-analisi 21 studi comprendente 1249 pazienti pubblicata da Al-Sukhi et al (9), così come in quella pubblicata da Zhang et al (10) condotta su 35 studi e 3143 pazienti, l'odd-ratio è significativamente più bassa nella valutazione della fattore N (8,3 95% CI 4,6-14,7) rispetto alla valutazione del T (20,4 95% CI 11,1 – 37,3) e dell'infiltrazione della fascia perirettale (56,1 95%CI 15,3-205,8).

2.1.b TIMING DELLA RISTADIAZIONE POST TRATTAMENTO NEO-ADIUVANTE

La rivalutazione deve essere programmata tra sei e otto settimane dal termine del trattamento integrato radio chemioterapico e deve comprendere le stesse metodiche di imaging ed endoscopia basali, ovvero: ecografia endorettale, RM pelvi, TC torace-addome con mdc.

Nella ristadiazione locale gioca un ruolo centrale, come già sottolineato, la RM in quanto consente di parametrare l'entità della risposta.

Al termine della fase diagnostica iniziale e della fase ristadiativa post trattamento il team multidisciplinare deve definire lo stadio clinico della malattia e il percorso terapeutico appropriato.

Nel tumore del retto localmente avanzato seguirà alla chemio radioterapia neo-adiuvante l'intervento chirurgico con TME e la successiva definizione di eventuale trattamento chemioterapico adiuvante in base alla stadiazione clinica radiologica e patologica definitiva e alle caratteristiche iniziali della neoplasia e cliniche del paziente.

3. IL TRATTAMENTO NEO-ADIUVANTE NEL TUMORE DEL RETTO LOCALMENTE AVANZATO (LARC)

Nello stadio cT3-4 N-/N+ M0 del retto medio-basso o in caso di neoplasia localizzata nel retto basso a meno di 2 cm dal margine anale interno il trattamento standard è rappresentato dalla radio-chemioterapia pre-operatoria a base di fluoropirimidina (5fluorouracile in infusione continua o capecitabina) in combinazione con radioterapia long course 5040 cGy in 28 frazioni da 180 cGy, seguita da resezione di retto con TME entro 8-10 settimane dal termine del trattamento preoperatorio.

In questo setting di pazienti la sola chirurgia è infatti associata ad un rischio di ripresa di malattia a livello pelvico superiore al 20%, specialmente in presenza dei seguenti fattori di rischio:

- Estensione del tumore oltre la parete del viscere
- Piccoli linfonodi positivi
- Tumori del retto distale
- Neoplasia del quadrante anteriore
- Escissione del mesoretto non adeguata (grasso o muscolare esposta)
- Exeresi non radicale (R1 o R2)
- Infiltrazione del margine circonfrenziale (CRM+) definito come presenza di neoplasia o linfonodi o gettoni neoplastici solidi a una distanza inferiore ad 1 mm dal margine circonfrenziale
- Asportazione di un numero inadeguato di linfonodi (< 12 se malattia non pretrattata)
- Grado di differenziazione G3-G4
- Perforazione nell'area tumorale

L'aggiunta della radioterapia alla chirurgia ha incrementato il controllo locale di malattia e in uno studio è risultata anche in grado di impattare positivamente sulla sopravvivenza (1). La radioterapia è stata negli anni somministrata con diverse modalità: preoperatoria, post-operatoria, short course, long course, da sola o associata alla chemioterapia. Tutte queste modalità hanno dimostrato un miglioramento degli outcomes oncologici dei pazienti con tumore del retto localmente avanzato operabile sia in epoca pre-TME che post-TME.

3.1. LA TECNICA, IL TIMING E LA MODALITA' DI RADIOTERAPIA NEO-ADIUVANTE

Il trattamento radioterapico prevede l'uso di sistemi di immobilizzazione, al fine di ottimizzare la riproducibilità del trattamento e di ridurre al minimo la dose agli organi sani circostanti. Il paziente

a vescica piena viene posizionato in posizione supina sul lettino TC, mediante appositi immobilizzatori (Combi-Fix, Vac Lock ecc..). La TC viene acquisita con scansioni ogni 3-5 mm da L5 (compresa) e fino a 3 cm caudalmente all' orifizio anale. Si identifica quindi una TC-slice di riferimento e si ripete l'acquisizione della medesima slice dopo posizionamento di tre reperi metallici corrispondenti agli assi longitudinali e laterali, identificati con laser. Su ciascuna TC-slice vengono quindi contornati i volumi di interessi: il Gross Tumor Volume (GTC), il Clinical Target Volume (CTV) e gli organi a rischio (OAR).

Il CTV comprende la neoplasia primitiva cioè il GTV, il retto, il mesoretto e i linfonodi regionali a rischio di interessamento subclinico della malattia, definiti in funzione dello stadio e della sede della neoplasia. Il fisico provvederà quindi alla elaborazione del piano di trattamento.

Attualmente la tecnica radioterapica più utilizzata è quella ad intensità modulata (IMRT) che permette di conformare in maniera più precisa la dose al target a fronte di una rapida caduta della dose in corrispondenza dei tessuti sani circostanti.

La dose totale prescritta è di 50.4 Gy. Nei trattamenti preoperatori è possibile aumentare la dose al tumore primitivo mediante un sovradosaggio.

In casi selezionati di pazienti con ridotto performance status (EGOC PS 1-2), non suscettibili di trattamento combinato protratto di radio chemioterapia preoperatoria per severe comorbidità, può essere scelto il trattamento "short course", che prevede 5 frazioni da 500 cGy per 5 giorni successivi (dose totale 2500 cGy) e successiva chirurgia.

L'impatto della radioterapia nel trattamento del LARC è stato ampiamente valutato in numerosi studi, così come la migliore tempistica di erogazione. Nello studio tedesco di Sauer et al (2) venivano randomizzati 850 pazienti affetti da tumore del retto localmente avanzato localizzato fino a 15 cm dal margine anale esterno stadio clinico II-III, a ricevere radio chemioterapia preoperatoria (5 fluorouracile in infusione continua in associazione a long course radioterapia 5040 cGy in 28 frazioni) verso lo stesso trattamento erogato dopo intervento chirurgico. I risultati hanno dimostrato una riduzione del 50% delle recidive locali in favore del trattamento preoperatorio (6% vs 13%, $p=0,006$) ed una riduzione significativa della tossicità precoce (diarrea) e tardiva (diarrea cronica, occlusione intestinale da radioterapia) (17% vs 40%, $p=0,001$).

Come confermato da altri studi precedentemente citati non è stato riscontrato un vantaggio statisticamente significativo in sopravvivenza cinque anni (76% vs 74%, $p=0,80$) seppur prevista in entrambi i bracci di trattamento una durata totale della chemioterapia di mesi sei (4 cicli concomitanti alla radioterapia pre o post operatoria e 4 cicli sequenziali). Tra gli end points secondari dello studio c'era la valutazione della preservazione sfinteriale nel trattamento pre rispetto al post operatorio, vantaggio risultato statisticamente significativo (39% vs 19%, $p=0,004$)

contrariamente a quanto emerso nello studio francese FFCD 9203 pubblicato da Bosset et al (41,7% vs 42,3%, $p=0,837$). (3;4)

Dalla revisione della letteratura e in linea con la nostra casistica, emerge che la dose impiegata nella trattamento chemioterapico e neoadiuvante varia fra 4500 e 5040 cGy (5). Le risposte patologiche complete sembrano essere incrementate dall'impiego di un sovradosaggio di radioterapia in associazione alla chemioterapia, risultando più elevate quando la dose supera 60 Gy senza aumento delle tossicità (6;7). Le nuove tecniche di erogazione della dose quali l'intensità modulata (IMRT) consentono di erogare anche un boost integrativo simultaneo (SIB, simultaneous integratde boost) sulla malattia macroscopica.

È sempre più frequente che la contornazione venga effettuata utilizzando la PET 18FDG come metodica di centratura. Questa tecnica tuttavia necessita ulteriori di ulteriori valutazioni prima di promuoverne un impiego nella pratica clinica, pertanto può essere utilizzata nell'ambito di studi clinici con l'obiettivo di incrementare la valutazione precoce della risposta patologica (8).

Modalità di erogazione alternativa allo standard long course è la già citata radioterapia ipofrazionata preoperatoria (short course, SCRT). Con questa modalità non si ottiene un downsizing del tumore, per cui non trova indicazione nelle neoplasie basse, se il tumore ha interessato o è in prossimità della fascia mesorettale oppure se infiltra significativamente il grasso perirettale (cT3c/d). Trova quindi indicazione in pazienti con carcinoma del retto medio alto come minima di infiltrazione del grasso perirettale (T3 iniziale < 5 mm con fascia mesorettale non infiltrata preservazione sfinteriale non è a rischio) o in casi selezionati per comodità come già accennato. Due studi randomizzati di confronto con la radiochemioterapia preoperatoria a frazionamento convenzionale non hanno evidenziato sostanziali differenze in outcome a lungo termine anche se si tratta di studi scarsamente dimensionati e non disegnati per testare la non inferiorità della SCRT (9;10).

Lo studio australiano ha randomizzato 326 pazienti con tumore del retto cT3 cN0-2 a ricevere radiochemioterapia convenzionale neoadiuvante (LCRT 5040 cGy in 28 sedute in associazione a 5 fluorouracile i.c.) verso SCRT (2500cGy in 5 giorni). Il tasso di recidiva locale a tre anni è stato del 7.5% vs 4.4% a favore della LCRT ($p=0.24$), mentre la sopravvivenza globale a cinque anni non ha evidenziato differenze statisticamente significative (74% SCRT vs 70 LCRT, $p=0.62$; HR 1.2 95%CI 0.76-1.67). Lo studio polacco ha invece randomizzato 312 pazienti con tumore del retto localmente avanzato cT3-4 e/o N+ a ricevere LCRT in associazione a chemioterapia neoadiuvante verso SCRT. I dati finali non dimostrano una differenza statisticamente significativa in recidiva locale (14% LCRT, 9% SCRT $p=0.17$), DFS (55.6% vs 58.4%, $p=0.82$) e OS a 4 anni (66.2% vs 67.2%). Limiti dello studio sono però rappresentati da dubbi criteri di stadiazione clinica iniziale, quale la valutazione della fissità del tumore mediante esplorazione rettale e riscontro di un'

incidenza significativamente più alta di positività del margine circonfenziale nei pazienti trattati con SCRT. Nello studio australiano invece la SCRT è risultata associata ad un tasso di recidive locali maggiore nei tumori del retto basso (48 vs 31 pazienti, $p=0.21$) e nei cT4.

Gli studi che hanno dimostrato l'efficacia nella riduzione delle recidive locali con la SCRT hanno incluso anche pazienti in stadio clinico I, mentre lo studio australiano ha incluso solo pazienti con neoplasia localmente avanzata, comprendente però solo lo stadio cT3.

Pertanto nei tumori con marcata infiltrazione di grasso perirettale (cT3 avanzato) trova indicazione la radiochemioterapia con la frazionamento convenzionale (LCRT) e a seguire la chirurgia.

Negli ultimi anni numerose pubblicazioni hanno affrontato la tempistica della chirurgia ritardata (4-8 settimane) verso la chirurgia immediata (1 settimana) al termine della SCRT (11;12). La recente pubblicazione dello studio di non inferiorità Stockholm III ha dimostrato un'efficacia locale simile fra SCRT con TME immediata, SCRT con TME ritardata e LCRT associata a chemioterapia convenzionale seguita da TME. La TME ritardata dopo SCRT sembra avere un minor tasso di complicanze rispetto a quella immediata. Questi approcci sono comunque da considerarsi ancora nell'ambito di sperimentazioni cliniche.

3.2 L'IMPATTO DELLA CHEMIOTERAPIA CONCOMITANTE NEO-ADIUVANTE

La combinazione di radio-chemioterapia è risultata migliorativa rispetto alla sola chemioterapia post operatoria nello studio di fase III NSABP R-02, con una riduzione delle recidive locali a cinque anni dal 13% al 8% ($p=0.02$) (13).

La migliore sequenzialità del trattamento radio chemioterapico è stato valutato nello studio di fase III condotto dal German Rectal Cancer Study Group (GRCSG): nel confronto tra radio e chemioterapia preoperatoria e post operatoria, il trattamento preoperatorio è risultato statisticamente significativo in termini di riduzione delle recidive locali a cinque anni (6% vs 13%, $p= 0.06$), compliance di trattamento, incidenza di tossicità acuta e a lungo termine (14).

Due studi hanno invece valutato il confronto tra radio-chemioterapia e la sola radioterapia preoperatoria: lo studio francese di fase III FFCO 9203 e lo studio dell' EORTC 22921, in cui veniva considerata anche l' aggiunta o meno di chemioterapia adiuvante post chirurgia. Il trial EORTC 22921 (15) ha randomizzato 1011 pazienti con carcinoma del retto localmente avanzato distribuiti in quattro gruppi (disegno 2x2 fattoriale) e ha valutato l'aggiunta del 5fluorouracile i.c. alla radioterapia neo adiuvante, alla radioterapia adiuvante o in entrambi i casi. Non sono stati evidenziati vantaggi in DSF e OS dall'aggiunta del 5fluorouracile i.c. concomitante, adiuvante o in entrambi i casi, ma l'incidenza di recidive locali è significativamente ridotta quando associato alla

radioterapia pre operatoria (11.8% vs 22.4%, $p= 0.0017$) così come il raggiungimento di risposte patologiche complete (pT0 13.7% vs 5.3%, $p < 0.001$).

Lo studio francese FFCD 9203 pubblicato da Gerard et al (3) ha randomizzato 733 pazienti con tumore del retto localmente avanzato a ricevere la sola radioterapia preoperatoria a frazionamento convenzionale verso radio chemioterapia contenente 5 Fluorouracile. Anche in questo studio non si sono riscontrate differenze significative in OS, a fronte di una riduzione statisticamente significativa delle recidive locali nel braccio di trattamento concomitante radio chemioterapico (8.15 vs 16.5%, $p < 0.05$).

In conclusione tutti degli studi di fase III hanno dimostrato un vantaggio della radio chemioterapia pre-operatoria nelle ridurre l'insorgenza delle recidive locali a cinque anni, ma non un vantaggio in sopravvivenza rispetto al trattamento post-operatorio e alla sola radioterapia pre-operatoria.

Due studi di fase III, lo studio MARGIT e lo studio NSABP- R04, sostengono nella radio chemioterapia pre- operatoria la semplificazione del regime di chemioterapia con la sostituzione del 5Fluorouracile i.c. con la capecitabina, fluoropirimidina orale (16;17). La non inferiorità della capecitabina rispetto al 5Fluorouracile i.c. concomitante alla radioterapia è stata dimostrata dal trial di fase III MARGIT condotto da Hofheinz et al. Lo studio ha randomizzato 401 pazienti affetti da tumore del retto localmente avanzato a ricevere radioterapia concomitante al 5Fluorouracile i.c. verso radioterapia concomitante a capecitabina nel setting neo adiuvante o adiuvante. Non è stata dimostrata alcuna differenza statisticamente significativa in sopravvivenza a cinque anni (75% vs 67%, $p=0.0004$) e nel tasso di recidive locali (6% vs 7%, $p= 0.67$). Lievemente superiore è stata la tossicità gastrointestinale con la capecitabina (9% vs 4% di diarrea G3-G4). Le linee guida AIOM 2017 confermano che la capecitabina al dosaggio di 825 mg/mq/bid 7 giorni su 7 dovrebbe essere presa in considerazione come alternativa al 5Fluorouracile i.c. nel trattamento integrato.

L'altro studio che ha valutato la sostituzione del 5Fluorouracile i.c. con la capecitabina è il trial NSABP-R04, dove però era prevista anche l'aggiunta di oxaliplatino. Gli studi randomizzati che hanno valutato l'intensificazione del regime di chemioterapia preoperatoria con l'introduzione dell'oxaliplatino sono complessivamente quattro: NSABP-R04, STAR-01, ACCORD 12/045-PRODIGE 02, CAO/ARO/AIO-04. Solo in quest'ultimo trial viene evidenziato un vantaggio nel tasso di risposta patologica completa, che pure raggiungendo la significatività statistica per il cospicuo campione di pazienti, non ha un effettivo rilievo clinico vista la minima differenza osservata (13% vs 17% $p= 0.045$). È stato inoltre osservato un vantaggio statisticamente significativo in DFS a tre anni per il braccio contenente oxaliplatino (75.9% vs 71.2%, HR 0.79, $p= 0.03$). Il limite dello studio è nell'aver utilizzato oxaliplatino nel braccio sperimentale sia nel setting neo adiuvante che adiuvante.

Come riportato nel commento delle linee guida AIOM 2017, i dati di outcome clinico di questi studi randomizzati suggeriscono un piccolo beneficio in DSF a 3 e 5 anni, che però raggiunge la significatività statistica solo nello studio di fase III condotto da Allegra et al in cui oxaliplatino veniva impiegato anche nel trattamento adiuvante post-operatorio (18).

Negli studi con un follow-up più lungo, tra cui il trial italiano STAR-01 (19), in cui il nostro centro ha contribuito in maniera consistente negli anni relativi alla casistica che verrà successivamente presentata, e il trial francese ACCORD 12/045-PRODIGE 02, entrambi con recente aggiornamento dei dati e pubblicazioni sul JCO, si osserva nel braccio trattato con oxaliplatino una riduzione del rischio di morte che pur non raggiungendo la significatività statistica appare stabile fino a 10 anni (differenza assoluta 5-6%, HR 0.71 95%CI 0.50-1.01; 0.82 95%CI 0.64-1.05).

È stata programmata una meta analisi degli studi europei per valutare su un campione di pazienti adeguato le differenze osservate.

4. LA CHIRURGIA NEL TRATTAMENTO DEL TUMORE DEL RETTO LOCALMENTE AVANZATO

Negli ultimi 30 anni la chirurgia del cancro del retto ha assistito a profonde innovazioni. Negli anni '90 vengono infatti perfezionate le tecniche di asportazione del retto dal promontorio sacrale al pavimento pelvico con l'introduzione dell'asportazione completa del mesoretto (TME) e la "nerve sparing technique" (NST). L'intervento chirurgico per via laparotomica o laparoscopica viene programmato a partire dalla 6^a ed entro la 10^a settimana dal termine della chemio radioterapia neo-adiuvante.

Le procedure di salvataggio degli sfinteri prevedono la resezione anteriore di retto, la resezione anteriore bassa e la resezione anteriore ultra bassa.

Nella resezione anteriore di retto le manovre consigliate sono la resezione del retto e del mesoretto, la legatura della vena mesenterica inferiore al di sotto del bordo inferiore del pancreas, la legatura dell'arteria mesenterica inferiore all'origine, la conservazione del canale anale munito del suo apparato sintetico. La continuità del tubo digerente può essere ricostruita con colon-retto anastomosi, colo-colostomia diretta o su J Pouch protetta con confezionamento di eventuale stomia.

Le stomie utilizzate in seguito ad una resezione anteriore del retto sono l'ileostomia e la colostomia sul trasverso. Una meta analisi Cochrane non ha evidenziato la superiorità di una tecnica rispetto all'altra. In particolare ha incluso cinque studi randomizzati con 334 pazienti totali analizzando la mortalità, i tassi di infezione, il tempo di chiusura della stomia, le fistole, le necrosi, le stenosi ed altre complicanze locali (1;2).

La chiusura della stomia dovrebbe essere eseguita, previa conferma radiologica dell'integrità dell'anastomosi, a partire da due mesi dal suo confezionamento o in relazione al termine di eventuale chemioterapia adiuvante prescritta. Ricanalizzazione precoci o più tardive sono comunque accettabili. Un recente trial clinico prospettico randomizzato ha evidenziato che una ricanalizzazione dopo due settimane dalla confezionamento della stomia sia equivalente se non vantaggiosa rispetto alla ricanalizzazione eseguita dopo due mesi (3;4). Viceversa un solo unico trial randomizzato su 186 pazienti ha dimostrato come la chiusura precoce della stomia (8 giorni) sia gravata da un più elevato tasso di complicanze della ferita (19% vs 7% $p=0.007$), al contrario le ostruzioni del tenue sono più frequenti con la chiusura tardiva. Fattori che possono influenzare la scelta fra chiusura anticipata e tardiva sono: la volontà del paziente il rischio di complicanze derivanti dalla chiusura della stomia, squilibri idroelettrolitici (più frequenti nei pazienti portatori di ileostomia) e contemporaneo trattamento chemioterapico.

La capacità di eseguire una corretta escissione totale del mesoretto deve necessariamente far parte del bagaglio dell'operatore per garantire una minore percentuale di recidive loco regionali e di complicanze post-operatorie. A tale fine il chirurgo deve rispettare alcuni principi fondamentali, quali: garantire l'integrità della fascia mesorettale, rispettare il margine di resezione radiale, eseguire la dissezione lungo il piano avascolare durante lo scollamento posteriore che separa l'aponeurosi di Waldeyer e la fascia mesorettale, garantire la clearance del margine distale (almeno 2 cm), eseguire una adeguata linfadenectomia.

I linfonodi paraortici e di altri distretti devono essere esaminati in estemporanea ed eventualmente asportati se ingrossati o sospetti, in accordo con la stadiazione preoperatoria. La lunghezza del margine di resezione prossimale deve essere > 5 cm.

Durante queste manovre è particolarmente importante evitare la perforazione del tumore in quanto associata ad un aumento delle recidive, indipendentemente dallo stadio anatomopatologico e dalla fissità della neoplasia.

La TME se in parte migliora l'incidenza di recidive pelviche ed aumenta la sopravvivenza a distanza, è però gravata da elevata morbilità per disfunzioni genito urinarie secondarie a lesioni nervose. Pertanto è stata proposta l'individuazione e la conservazione dei nervi con la "nerve sparing technique". Grazie a questa metodica si è avuta una netta riduzione di sequele genito urinarie: la disuria presente nel 14. 5% dei casi senza NST si è azzerata nei pazienti sottoposti a NST, diventando il disturbo lieve nel 93. 2%; stessa cosa per l'impotenza (36. 1% vs 9.2%) ed i disturbi dell'eiaculazione (84. 3% vs 47%).

Differente tecnica chirurgica è l'amputazione del retto per via addomino perineale, effettuata nelle condizioni di impossibilità di garantire il margine distale di sicurezza, incompetenza dell'apparato sfinteriale, difficoltà tecnica alla ricostruzione. Questa tecnica si caratterizza per un tempo addominale (escissione totale del mesoretto, legatura della vena mesenterica inferiore, legatura o meno dell'arteria mesenterica inferiore all'origine, confezionamento di colostomia definitiva) e di un tempo perineale (asportazione del retto e del suo apparato sfinterico). La qualità dell'intervento chirurgico impatta fortemente sulla prevenzione delle recidive locali e sulla sopravvivenza, pertanto, la chirurgia del cancro del retto dovrebbe essere eseguita da operatori di esperienza come dimostrato dai dati di letteratura, che sottolineano come i casi trattati da operatori con ridotto numero di interventi l'anno presentano risultati peggiori in termini di aumento della mortalità, maggior frequenza di recidive e minore sopravvivenza.

Numerosi studi randomizzati di fase III sono stati condotti con lo scopo di confrontare la tecnica open con quella laparoscopica e hanno dimostrato la fattibilità della TME laparoscopica e i vantaggi di questa in relazione agli outcomes a breve termine. (5;6).

Tuttavia due recenti trial riportano tassi di positività del margine circonfrenziale e mancata integrità del piano di dissezione mesorettale significativamente superiore con la tecnica laparoscopica rispetto alla open.

Il primo trial di non inferiorità pubblicato da Fleshman et al ha randomizzato 462 pazienti con carcinoma rettale candidati a chirurgia laparoscopica verso chirurgia open.

I tassi di resezione adeguata sono stati del 81.7% in laparoscopia e 86.9% nella tecnica open, dati che non hanno permesso di supportare la non inferiorità (differenza -5.3%, p per non inferiorità=0.41) (7). Un'altro trial ha randomizzato 475 pazienti senza riuscire a dimostrare la non inferiorità della laparoscopia verso la chirurgia sia in termini di qualità della TME (82% vs 89%) che per tasso di margini circonfrenziale negativo (93% vs 97%). L'impatto sulla sopravvivenza necessita tuttavia di un lungo follow-up, pertanto le linee guida AIOM 2017 consigliano l'uso della chirurgia laparoscopica in centri ad alto volume e in stadi non avanzati (es T4), essendo una tecnica altamente operatore dipendente (8).

Altra tecnica recentemente in diffusione è la TA-TME (Trans Anal Total Mesorectal Excision), dove la TME laparoscopica viene eseguita con doppio accesso, addominale e transanale. Non vi sono trial clinici randomizzati che dimostrino la non inferiorità della TA-TME rispetto alla TME standard laparoscopica. Anche in questo caso è richiesta una notevole esperienza del chirurgo e se ne consiglia l'applicazione in centri altamente qualificati preferibilmente all'interno di studi clinici prospettici (9).

Per i pazienti che raggiungono una risposta clinica e radiologica completa dopo chemio radioterapia, la chirurgia con TME rappresenta ancora oggi uno standard in quanto non esistono dati consolidati da studi randomizzati né confermati dal lungo periodo di follow-up che dimostrino un'uguale efficacia dell'escissione locale o dell'approccio non operativo (NOM, non operative management) anche noto come Watch-and-Wait Approach. (10).

Entrambi questi approcci sono da ritenersi sperimentali.

Nell'ambito del NOM per convogliare il più velocemente possibile i dati e il follow-up dei pazienti coinvolti, è stata creata una piattaforma online International Watch-and-Wait Database Consortium (IWWD), alla quale ad oggi aderiscono 35 istituzioni di 11 paesi.

La prima revisione dei dati è stata presentata nell'ambito del congresso americano ASCO GI 2017, con un dataset di 775 pazienti e un follow-up mediano di 2.6 anni. Il 25% dei pazienti è stato successivamente sottoposto ad intervento per ripresa locale di malattia entro due anni, il 7% ha sviluppato metastasi a distanza. Il tasso di sopravvivenza a 3 anni è risultato pari al 91%, mentre nei pazienti con ripresa di malattia pari all'87%. I risultati sono assolutamente incoraggianti ma necessitano di conferme (11).

5. STADIAZIONE ANATOMO-PATOLOGICA

L'esame anatomopatologico è di fondamentale importanza nella corretta stadiazione della neoplasia asportata. Il pezzo operatorio deve essere inviato a fresco, con repere chirurgico che per convenzione è posto ad indicare la legatura dell'arteria mesenterica superiore. Viene quindi fissato per 24 ore in formalina tamponata al 10%.

Nella *descrizione macroscopica* del pezzo operatorio devono essere specificati:

- dimensione del viscere;
- dimensione della lesione;
- misurazione della distanza della lesione dal margine di resezione distale;
- valutazione dell'integrità del piano mesorettale;
- numero di linfonodi totali

Dopo la valutazione macroscopica il margine di resezione sul mesesoretto, ovvero il margine radiale o circonferenziale ovvero la superficie esterna del mesoretto, viene marcato con inchiostro di china, prelevato e quindi esaminato microscopicamente in toto.

Il campionamento del margine di resezione distale avviene per intero con unica sezione trasversale o con più sezioni lungo l'asse longitudinale delle viscere, a seconda della distanza della lesione dalla margine in questione. Si consiglia la misurazione dell'estensione del mesoretto in cm sia sulla parete posteriore (dall'apertura al margine distale) che sulla parete anteriore (dalla riflessione peritoneale al margine distale). La superficie esterna mesorettale deve essere quindi valutata e descritta secondo i criteri di Quirke et al (1) distinguendo tra mesoretto completo, irregolare e incompleto (rispettivamente grado 3,2,1) (2;3).

A questo proposito lo studio prospettico osservazionale di Maslekar et al ha evidenziato come la qualità della TME valutata secondo i criteri di Quirke correla strettamente con l'outcome oncologico: i pazienti con resezione completa G3 riportano tassi di recidive locali a distanza rispettivamente dell' 1.6% e 1.6%, i pazienti con resezione irregolare G2 rispettivamente del 5.7% e 17%, mentre in quelli con resezioni incomplete G1 i tassi risultano notevolmente più alti e rispettivamente pari al 41% e 59% (4).

Non può essere mancante nel referto istologico la distanza in millimetri tra neoplasia e margine radiale mesorettale (CRM) evidenziato con china: il margine è da considerarsi coinvolto quando la distanza tra la neoplasia invasiva e il margine radiale è inferiore a 1 mm anche se è stato recentemente proposto un cut-off di 2 mm. Un CRM < 2 mm è associato ad un rischio di recidiva locale del 16% verso il 6% dei pazienti con CRM > 2 mm. Se il CRM risulta < 1 mm il rischio di

ricidiva locale sale alle 37% e questo impatta anche negativamente sulla sopravvivenza. Il valore prognostico del CRM è indipendente dal TNM (5).

La descrizione dettagliata del coinvolgimento del margine radiale è indispensabile in quanto è un fattore predittivo di recidiva locale e metastasi a distanza, inoltre risulta uno dei fattori prognostici più importanti in analisi multivariata (6).

La presenza di margine radiale positivo per tessuto linfonodale sembra avere una ricaduta prognostica locale inferiore rispetto al margine positivo per estensione diretta del tumore.

La neoplasia viene quindi prelevata nella sua totalità, in quanto la fibrosi indotta dalla radioterapia pre operatoria può creare problemi nella valutazione macroscopica del punto di massima infiltrazione.

Nella ricerca dei linfonodi si distinguono tre stazioni linfonodali: i linfonodi apicali isolati in corrispondenza del reperi chirurgico, i linfonodi inferiori isolati a partire dal reperi chirurgico fino alla biforcazione dell'arteria rettale superiore e i linfonodi para-rettali isolati a partire dalla biforcazione dell'arteria rettale superiore fino alla parete del viscere.

La *descrizione microscopica* deve invece comprendere:

- istotipo della lesione secondo WHO;
- grado di differenziazione, ovvero basso grado se ben o moderatamente differenziato, alto grado se poco differenziato;
- livello di infiltrazione della neoplasia ypT (mucosa, sottomucosa, tonaca muscolare propria, grasso perirettale);
- numero di linfonodi metastatici ypN;
- numero di linfonodi totale esaminati, indicando il possibile superamento della capsula linfonodale e segnalando l'eventuale presenza di emboli neoplastici nei vasi linfatici. Il numero minimo di linfonodi da esaminare è pari a 12 nella chirurgia TME up-front, mentre nei campioni sottoposti a radio chemioterapia neoadiuvante non esiste un numero minimo. Attualmente non vi sono raccomandazioni sul numero massimo di linfonodi da isolare e anche il numero minimo richiesto dalle linee guida TNM e NICE appare arbitrario.
- margini di resezione prossimale, distale e radiale o circonferenziale (CRM) devono essere considerati positivi se sono presenti cellule neoplastiche sul margine e /o a meno di 1 mm da esso;
- presenza di budding tumorale (sec. Ueno);
- infiltrazione perineurale;
- invasione vascolare intramurale;
- trombosi neoplastica peritumorale;

- quota di infiltrato infiammatorio linfoplasmacellulare peri ed intratumorale;
- grado di regressione tumorale (TRG) con specifica della classificazione utilizzata;
- laghi di muco.

La risposta al trattamento neo adjuvante nel tumore del retto è caratterizzata da modificazioni istologiche che includono alterazioni citologiche quali vacuolizzazione citoplasmatica, pleomorfismo nucleare, così come modificazioni strutturali quali la fibrosi e l'accumulo di laghi di mucina dove precedentemente era presente il tumore. I metodi proposti per valutare il grado di regressione tumorale più frequentemente utilizzati sono: la classificazione di Mandard, nata per valutare la risposta a trattamenti pre-operatori nel cancro dell'esofago, la classificazione di Dworak, nata per valutare la risposta ai trattamenti altri operatori nel cancro del retto, a cui si sono aggiunte negli anni la classificazione secondo AJCC e CAP (tabella n.1).

E' quindi importante definire a quale ci si riferisce, essendo alcune tra loro speculari.

Il TRG ha un valore prognostico e come si può osservare dei dati provenienti dallo studio CAO/ARO/AIO-94 un TRG4, ovvero una risposta patologica completa, correla ad una DFS a cinque anni dell'86%, se TRG2-3 del 75%, mentre in caso di risposta minima assente ovvero TRG0-1 del 63% , seppur ai limiti della significatività statistica ($p=0.06$). (7;8)

La risposta patologica completa (pCR) è definita come l'assenza di residui di neoplasia morfologicamente identificabile sul campione chirurgico e si osserva in circa il 14-20% dei pazienti (9). È un fattore prognostico dimostrato in diversi studi. Una recente meta-analisi di 16 studi su 3363 pazienti ha dimostrato che la risposta patologica completa è associata a sopravvivenza a lungo termine con ridotta incidenza di recidiva locale e localizzazione distanza di malattia (10).

In uno studio di confronto tra pazienti con pCR e pazienti con risposta incompleta è stata osservata una DFS pari al 83.3% verso 65.6%, tassi di recidiva locale del 2.8% verso 9.7%, metastasi a distanza 11.2% verso 25.2% (11).

L'eventuale risposta colloidale si presenta nelle 13-30% con laghi di muco. Secondo il Consensus Statement del College of American Pathologists la produzione di muco è un tipo di risposta alla terapia pertanto i laghi di muco cellulari non devono essere valutati come tumore residuo non correlando con la ricorrenza locale (12) tuttavia alcuni autori suggeriscono che una loro presenza possa ridurre il tasso di DFS e OS (13).

Table 1. Tumor regression grade (TRG) systems

	Dworak	Mandard	Ryan	AJCC	Modified Dworak (pT+pN) ^a
Complete regression	No tumor cells (TRG 4)	No residual cancer cells (TRG 1)	No viable cancer cells, or single cells, or small groups of cancer cells (TRG 1)	No viable cancer cells (TRG 0)	No tumor cells (TRG 4)
Near complete regression	Very few tumor cells (TRG 3)	Rare residual cancer cells (TRG 2)	-	Single or small groups of tumor cells (TRG 1: moderate response)	Very few tumor cells (one or two microscopic foci of < 0.5 cm in diameter) (TRG 3)
Moderate regression	Dominantly fibrotic changes with few tumor cells or groups (TRG 2)	Predominant fibrosis with increased number of residual cancer cells (TRG 3)	Residual cancer outgrown by fibrosis (TRG 2)	Residual cancer outgrown by fibrosis (TRG 2: minimal response)	Dominantly fibrotic changes with few tumor cells or groups (TRG 2)
Minimal regression	Dominant tumor mass with obvious fibrosis (TRG 1)	Residual cancer outgrowing fibrosis (TRG 4)	Significant fibrosis outgrown by cancer, or no fibrosis with extensive residual cancer (TRG 3)	Minimal or no tumor cells killed (TRG 3: poor response)	Dominant tumor cell mass (> 50%) with obvious fibrosis or no regression (TRG 1)
No regression	No regression (TRG 0)	No regressive change (TRG 5)	-	-	-

AJCC, American Joint Committee on Cancer. ^aModified Dworak TRG was used to evaluate both the primary tumor and regional lymph nodes as a whole.

5.1 STADIAZIONE: VIII versione TNM-UICC 2016 /VII edizione AJCC 2018

La storica classificazione secondo Dukes può essere ancora utilizzata se integrata con l' VIII versione TNM-UICC 2016 o con la VII edizione AJCC 2018.

Rispetto alle precedenti versioni viene sottolineata l'importanza di specificare la presenza o meno di depositi tumorali satelliti, costituiti da noduli tumorali micro o macroscopici rilevati nel tessuto adiposo periviscerale, discontinui rispetto alla neoplasia primitiva asportata, senza evidenza di residui linfonodali, strutture vascolari o neurali (categoria TNM N1c).

Una recente revisione della letteratura e una metanalisi pubblicata sul Journal of Clinical Oncology nel 2017 condotta su 10106 pazienti, ha dimostrato un ruolo prognostico dei depositi satelliti ed una loro correlazione con la presenza di metastasi linfonodali e EMVI con conseguente impatto negativo sulla DFS e sull' OS (14).

Tutti i tumori rettali classificati dopo trattamento neo-adiuvante devono riportare il prefisso “yp”, mentre quelli recidivati dopo un intervallo libero di malattia il prefisso “rp”.

6. TRATTAMENTO CHEMIOTERAPICO ADIUVANTE

Il rischio di ripresa di malattia nei pazienti con carcinoma del retto localmente avanzato sottoposti a radio chemioterapia preoperatoria è correlato sia alla risposta patologica che allo stadio clinico iniziale, in quanto rappresenta un fattore prognostico anche nei pazienti con risposta patologica completa (1;2).

E' stimato che circa il 35% dei pazienti sottoposti a chirurgia radicale andrà incontro a recidive di malattia con più alta frequenza (80%) nei primi 2-3 anni dall'intervento chirurgico e solitamente entro i primi cinque anni di osservazione.

Dall'analisi degli studi nord-americani NCCTG 79-47-51, NCCTG 86-47-51, INTO114, NSABP R0-1 e R0-2, viene riscontrato un vantaggio in sopravvivenza per i pazienti sottoposti in fase post operatoria a trattamento chemioterapico (3).

Nello studio di fase III Quasar (4) che comprendeva 3239 pazienti con carcinoma del colon-retto in stadio II a basso rischio di ricaduta, si è osservato nel sottogruppo di 948 pazienti affetti da carcinoma del retto (di cui 399 sottoposti a radioterapia pre-operatoria) un vantaggio in sopravvivenza a favore della chemioterapia adiuvante a base di 5-Fluorouracile con un HR di 0.69 (95%CI 0.49-0.98, p=0.037).

Nello studio EORTC 22921, il sottogruppo di pazienti con stadio ypT0-2 che dopo trattamento preoperatorio aveva ricevuto un trattamento adiuvante, presenta un vantaggio statisticamente significativo in sopravvivenza con HR di 0.69 (95%CI 0.42-0.96, p=0.03) (5).

Non è mai stato disegnato uno studio per dimostrare la non inferiorità di un trattamento radio chemioterapico senza chemioterapia adiuvante rispetto allo standard di sei mesi di chemioterapia totali.

Secondo lo studio ADORE, recentemente pubblicato su Lancet, l'associazione di oxaliplatino alla fluoropirimidina orale/5-Fluorouracile i.c. nei regimi Xelox/Folfox, determina un miglioramento della sopravvivenza libera da malattia a tre anni rispetto ad un trattamento adiuvante con fluoropirimidina in monoterapia. La selezione dei pazienti ha certamente impattato in questo risultato, venivano infatti inclusi pazienti con le seguenti caratteristiche: persistenza di malattia residua trasmurale e/o persistenza di coinvolgimento linfonodale dopo trattamento radio chemioterapico stadio II-III). Sono stati selezionati 321 pazienti stadio yp T3-T4 e ypTanyN+ a ricevere regine Folfox verso 5-Fluorouracile i.c. adiuvante. La differenza in DFS è risultata statisticamente significativa con un delta di circa 9% (71.6% vs 62.9%, HR 0.657, p=0.047) (6).

Anche lo studio tedesco CA0/ARO/AIO-04 ha concluso che l'impiego di Folfox in adiuvante dopo trattamento radio chemioterapico preoperatorio con fluoropirimidine conferisce un vantaggio

statisticamente significativo in DFS a 3 anni a favore del braccio Folfox (75.9% vs 71.2%, HR 0.79, $p= 0.03$). Il minore vantaggio rispetto allo studio ADORE può essere spiegato dall'assenza di selezione per scarsa risposta al trattamento preoperatorio. Con una raccomandazione clinica positiva debole secondo metodo GRADE le linee guida AIOM 2017 consigliano l'aggiunta di oxaliplatino nel setting adiuvante in pazienti con neoplasia yp T3-T4 e ypTanyN+.

Risulta complessa la definizione del grado di risposta al trattamento preoperatorio.

I dati che dimostrano un effetto differenziale della chemioterapia adiuvante a base di 5-Fluorouracile con un vantaggio in DFS e OS nei pazienti con down-staging post-operatorio, non vengono però confermati da una recente meta-analisi condotta da Valentini et al. Gli autori sottolineano come l'uso di nomogrammi potrebbe favorire la quantificazione delle beneficio della chemioterapia adiuvante come già accade ad esempio nella tumore della mammella (7).

Ulteriore riflessione sul beneficio e sulla durata della chemioterapia adiuvante è d'obbligo dopo la pubblicazione dello studio IDEA, che ha confrontato tre mesi verso sei mesi di regime Folfox/Xelox adiuvante nei carcinomi del colon stadio II-III. La popolazione non era selezionata per carcinoma del retto localmente avanzato, ma un'estrapolazione pone quantomeno la questione circa la durata ottimale del trattamento adiuvante.

Qualora non fosse stato possibile o adeguatamente pianificato un trattamento neo adiuvante radio chemioterapico, i pazienti con stadio patologico pT3-T4 e pTanyN+ dovrebbero essere sottoposti a trattamento radio chemioterapico post operatorio, seppur nel setting adiuvante è nota una minore efficacia nella riduzione delle recidive e una maggiore tossicità intestinale (8).

Il trattamento adiuvante radio chemioterapico dovrebbe comprendere due mesi di regime Xelox/Folfox seguiti da trattamento concomitante con la medesima fluoropirimidina e radioterapia, e successivi due mesi di regime Xelox/Folfox.

6.1 POSSIBILI SCENARI FUTURI

L'obiettivo di incrementare la risposta patologica completa, il down-sizing tumorale, i tassi di DFS e OS, ha portato a numerosi studi di fase II-III sia in ambito radioterapico che chemioterapico.

Il recente concetto della NACT (Total Neoadjuvant Chemotherapy Approach) applicato nel setting neo adiuvante deriva dall'ipotesi di un precoce effetto sulle micro metastasi e di una migliore compliance dei pazienti e non ancora gravati dalle tossicità secondarie al trattamento radio chemioterapico e chirurgico.

Nello studio di fase II di Fernandez-Martos et al sono stati inclusi 108 pazienti affetti da tumore del retto localmente avanzato randomizzati a ricevere xelox + radioterapia seguita da TME e xelox

adiuvante verso 4 cicli xelox di induzione seguiti da 4 cicli xelox + radioterapia. End point primario dello studio è la pCR che non ha evidenziato differenze significative, ma si è registrata una minore tossicità e maggior compliance nelle braccia della chemioterapia di induzione (9).

Studi con analogo disegno vengono pubblicati tra il 2008 e il 2014, dove l'eterogeneità della popolazione selezionata, come il sottogruppo definito a basso rischio secondo alcuni criteri di valutazione RM nel trial di fase II condotto da Chua et al, giustifica tassi di pCR variabili tra il 20% e il 32%.

Nella fase pre-operatoria è attualmente in corso il RAPIDO trial, studio di fase III in cui i pazienti con tumore del retto localmente avanzato stadio patologico cT3-T4 e cTanyN+ sono randomizzati a ricevere radioterapia short-course seguita da 6 cicli regime folfox/xelox e successiva TME verso approccio multimodale standard.

Altro studio in corso sempre finalizzato a valutare l'impatto della NACT è il trial francese di fase III Neofirinox (10), dove i previsti 460 pazienti vengono randomizzati a ricevere regime folfirinox (5Fluorouracile i.c. in associazione ad oxaliplatino ed irinotecano) di induzione seguito da chemio e radioterapia neo-adiuvante verso il trattamento radio chemioterapico neo-adiuvante standard.

Ulteriore scenario futuro è rappresentato dall'introduzione dell'immunoterapia in associazione al trattamento radio chemioterapico adjuvante standard e nel periodo finestra pre operatorio. Numerosi sono gli studi di fase II on-going, dei quali attendiamo il risultato specialmente nel sottogruppo negativo per instabilità micro satellitare (MSI), che rappresenta la maggioranza dei pazienti candidati alla trattamento.

Criticità comune di tutti gli studi è il rischio di overtreatment e il peggioramento della qualità di vita specialmente nel setting di pazienti cT3 early N0, dove oggi non è così fortemente supportato dalla letteratura il trattamento adjuvante contenente oxaliplatino.

Lo sviluppo di nanogrammi standardizzati che possano integrare informazioni provenienti da tecniche di imaging altamente specialistiche come la DWI-RM e la rivalutazione precoce PET18FDG con fattori clinici e bio-patologici predittivi e prognostici di risposta, riteniamo sia una strada da percorrere nell'obiettivo di personalizzare le cure, aumentando il tasso di pCR e riducendo le note tossicità acute tardive.

7. FATTORI PROGNOSTICI E PREDITTIVI NEL CARCINOMA DEL RETTO LOCALMENTE AVANZATO

Come già sottolineato nei precedenti capitoli esiste una reale necessità di identificare biomarcatori predittivi di risposta al trattamento chemio radioterapico neoadiuvante (nCRT) per selezionare i pazienti che ne possano maggiormente giovare, per ridurre le tossicità secondarie ad un inefficace trattamento combinato preoperatorio e per offrire valide alternative terapeutiche nell'ottica della personalizzazione del trattamento.

Da una revisione sistematica della letteratura emergono quattro campi applicativi di predizione della risposta al trattamento neo-adiuvante:

- *fattori clinici*, ovvero le dimensioni del tumore, lo stadio clinico cT e cN, la distanza delle tumore dalla margine anale esterno, l'intervallo temporale tra la fine del nCRT e la chirurgia;
- *fattori patologici*, quali il grado di differenziazione tumorale, istologia mucinosa, margine circonfrenziale, presenza di ulcerazione macroscopica spesso associata a scarsa risposta al nCRT;
- *modalità di acquisizione delle immagini*, ovvero DWI-RM ed ecografia endorettale routinariamente utilizzati nella stadiazione pre e post trattamento per definire l'eventuale coinvolgimento del margine di resezione circonfrenziale e l'entità della risposta;
- *biomarcatori molecolari tissutali e/o ematici*, che sebbene abbiano un potenziale di predizione della risposta al nCRT non hanno ancora oggi un'applicabilità clinica.

Nella revisione pubblicata dal gruppo di ricerca del MD Anderson Cancer Center nel 2017 e pubblicata da Dayde et al (1), emergono tra i marcatori tissutali molecolari: mutazioni a carico del DNA, ovvero alterazioni del numero di copie geniche e mutazioni di p53. Risulta infatti da una meta analisi citata, una forte associazione tra wt p53 e buona risposta al nCRT in 1830 pazienti affetti da LARC esaminati.

Gene expression profiles vengono presi in considerazione per identificare delle signatures geniche associate a risposta al nCRT, così come proteine e metaboliti, microRNA ambiente immunitario peri ed intratumorale.

Tra i biomarcatori ematici più studiati ritroviamo l'andamento dell'antigene carcinoembrionario (CEA), il cui ruolo predittivo di risposta nella pratica clinica è ancora poco chiaro essendo i dati contrastanti circa la correlazione tra elevati valori di CEA in risposta al trattamento, piuttosto che bassi valori dopo il nCRT in presenza di risposta patologica completa.

Dati interessanti provengono anche dall'analisi di micro-RNA, cellule tumorali circolanti, biopsie liquide pre e post nCRT, risposta immunitaria e studio dei polimorfismi dei singoli nucleotidi.

Nei successivi paragrafi saranno valutati nel dettaglio il ruolo prognostico e predittivo emergente dalla letteratura di sei fattori biomolecolari espressi dalla neoplasia e valutati mediante immunohistochimica, specificatamente analizzati nella nostra casistica retrospettiva: TS, p53, Ki-67, Bcl-2, EGFR, MSI (2).

7.1 TIMIDILATO SINTETASI

La timidilato sintetasi (TS) è un enzima limitante responsabile della metilazione di deossiuridina monofosfato a deossi-timidina monofosfato, meccanismo fondamentale per la sintesi di DNA in quanto il solo a garantire la formazione de nuovo di timidina. L'attività di TS e i suoi livelli proteici sembrano essere maggiori nelle cellule proliferanti rispetto a quelle quiescenti con conseguente massima espressione in fase S del ciclo cellulare: ciò potrebbe spiegare l'aumento dei livelli a carico della mucosa intestinale interessata da neoplasia rispetto all'adiacente sana.

Il meccanismo di azione dell'agente chemioterapico 5-Fluorouracile è proprio la soppressione di TS attraverso un legame covalente del suo metabolita attivo 5fluoro-2'deossiuridina-5'monofostato (FdUMP) a TS. L'inibizione di TS viene potenziata dall'acido folinico che stabilizza nel tempo il legame covalente con FdUMP, giustificando la sua infusione contestualmente a quella continua del 5-Fluorouracile.

È stato dimostrato da numerosi studi clinici che TS abbia ruolo di risposta al trattamento con 5-Fluorouracile e che sia implicata nella resistenza al 5-Fluorouracile stesso: si osservano infatti elevati livelli di TS all'interno delle cellule neoplastiche quale meccanismo di resistenza la chemioterapia base di fluoro (2).

È stato inoltre evidenziato che il 5-Fluorouracile agisce in diversi modi a seconda della modalità di somministrazione: quando somministrato in bolo sembra avere un effetto maggiore a livello di RNA, mentre in infusione continua a basse dosi inibisce prevalentemente la TS.

7.1.a Valore prognostico e predittivo di TS nel tumore del retto: revisione della letteratura

A partire dal 2003 compaiono in letteratura numerosi studi che valutano il ruolo prognostico e predittivo di TS nel tumore del retto sottoposto a trattamento neo-adiuvante combinato o alla sola radioterapia pre-operatoria.

Purtoppo l'eterogeneità del campione, le diverse tecniche immunoistochimiche e periodi di follow-up talvolta troppo brevi non hanno consentito di arrivare ad un giudizio unanime sul ruolo di TS. Oggi non è infatti prevista la sua valutazione standardizzata.

Nello studio pubblicato da Saw et al nel 2003 venivano confrontati i livelli di espressione immunoistochimica di TS in pazienti affetti da LARC sottoposti a trattamento con radio chemioterapia o radioterapia da sola. Si dimostrava un valore predittivo di down-staging solo nel gruppo di pazienti sottoposti a radio chemioterapia ($p=0.047$) (3). Il gruppo di lavoro coordinato da Jakob pubblica nel 2005 un lavoro dove si valutava la correlazione tra espressione immunoistochimica di TS e TRG. I risultati confermano un'associazione statisticamente significativa tra espressione di TS nella biopsia e TRG ($p=0.04$) ed una significativa riduzione di TS dopo il trattamento neo-adiuvante nel pezzo operatorio ($p=0.02$). Gli autori hanno successivamente confrontato i risultati ottenuti da una precedente analisi delle 2004 che aveva vantato l'espressione di mRNA di TS con i risultati di espressione immunoistochimica di TS, concludendo che la combinazione delle due metodiche non incrementa la capacità di distinguere i "responder" dai "non-responder" (4).

Lo stesso gruppo di lavoro nel 2006 pubblica un ulteriore lavoro circa il ruolo prognostico dell'espressione genica di TS nel pezzo operatorio, riscontrando una significativa correlazione tra alti livelli di espressione genica di TS e incrementato rischio di ripresa di malattia ($p=0.028$) (5).

Liersch et al hanno valutato il ruolo prognostico dell'espressione genica di TS dopo radio chemioterapia evidenziando che, nel sottogruppo di pazienti negativi per downstaging e nei pazienti con ripresa di malattia si osservava un incremento significativamente più alto dell'espressione genica di TS (6).

L'analisi italiana condotta dal gruppo modenese di Bertolini et al non conferma il valore predittivo né prognostico dell'espressione proteica di TS valutata con immunoistochimica in 91 pazienti trattati con chemio radioterapia neo-adiuvante a base di 5-Fluorouracile. Risultato analogo viene ottenuto dal lavoro pubblicato nel 2008 da Negri et, dove non risulta alcun valore è prognostico né predittivo di TS. Nello studio si valutava infatti il valore predittivo di risposta al trattamento neoadiuvante delle espressioni immunoistochimica di TS in 57 pazienti sottoposti a trattamento con radioterapia in associazione o meno a 5-Fluorouracile ed oxaliplatino. Gli autori sottolineano come nel sottogruppo di pazienti trattati con radioterapia l'espressione immunoistochimica di TS nelle biopsie è risultata più elevata nei pazienti "responder". (7)

Riflessione analoga è quella che emerge dal lavoro giapponese pubblicato da Kikuchi et al, dove risulta però statisticamente significativo il valore predittivo dell'espressione proteica di TS

valutata con immunohistochimica nei pazienti “responder” ovvero (TRG sec. Dworak 3-4) rispetto ai “non responder” (TRG sec. Dworak 0-2), $p < 0.05$. Limite dello studio è l’associazione chemioterapica differente rispetto agli standard europei ed americani in quanto a base di S1, fluoropirimidina orale, ed irinotecano (8).

Conradi et al in uno studio pubblicato nel 2011 hanno valutato il ruolo predittivo e prognostico in 167 casi del livello di espressione di TS e dei genotipi di 28 paia di basi nucleotidiche nella sequenza 5’. Non viene confermato il valore predittivo ma solo quello prognostico: i pazienti con le più alti livelli di TS basali hanno una migliore sopravvivenza ($p=0.01$), mentre i pazienti con bassi livelli di TS nel pezzo operatorio presentano un’alta probabilità di avere ripresa di malattia ($p=0.04$). L’analisi genotipica, in linea con quanto presente in letteratura (9), ha mostrato come i pazienti con genotipo 3/3 hanno livelli di espressione proteica attivata sia nella biopsia sia nel pezzo operatorio (10). In contrapposizione a tali conclusioni è invece il risultato che emerge dalla casistica di Tanaka et al, dove il rischio maggiore di sviluppare la ripresa di malattia è proprio dei pazienti con alti livelli di espressione genica di TS nel pezzo operatorio ($p=0.01$) (11).

7.2 PROTEINA P53

Il gene che codifica per la proteina p53 è un oncosoppressore responsabile del mantenimento della stabilità genica cellulare e per questo noto anche come “guardiano del genoma”.

Mutazioni a suo carico si riscontrano in più del 50% dei tumori umani . La proteina p53 si attiva in presenza di un danno a carico del DNA e determina l’arresto del ciclo cellulare o apoptosi, a seconda che la cellula stia replicando o meno il proprio DNA. L’arresto cellulare avviene in fase G1 attraverso l’attivazione di p21 da parte del legame di p53 al gene waf1 sul DNA. In questa fase, la cellula può provare a riparare gli errori sul codice genetico ed in caso di riuscita p53 attiva il gene mdm2, il cui prodotto degrada p53 stessa. Al contrario se il danno non è riparabile p53 induce apoptosi cellulare attraverso l’attivazione del gene bax, che va ad inibire la proteina anti-apoptotica Bcl-2.

In caso di mutazioni o delezioni di p53 si perde uno dei principali meccanismi di riparazione il danno del DNA con il conseguente aumento della probabilità di danni genetici cellulari e di trasformazione neoplastica. Si ritiene pertanto che la sovra espressione di p53, valutata attraverso immunohistochimica o mediante il riscontro di mutazioni all’interno del gene che la codifica, correli con una peggior prognosi di malattia. Inoltre è stata verificata una correlazione tra p53 wild-type nelle cellule tumorali e sensibilità al danno indotto da radiazioni e

chemioterapia, rispetto a meccanismi di radio e chemio-resistenza tipici di p53 mutata. (12;13;14;15).

7.2.a Valore prognostico e predittivo di p53 nel tumore del retto: revisione della letteratura

La maggior parte degli studi non hanno evidenziato alcuna correlazione tra espressione di p53 e outcome clinico. L'espressione è stata valutata con immunohistochimica (IHC), mentre il polimorfismo genico con PCR.

Una colorazione IHC positiva indica la presenza di fenotipo non funzionante, mentre una colorazione negativa riflette al contrario un fenotipo funzionante. In alcuni la positività immunohistochimica di p53 è predittiva di buona risposta alla trattamento neoadiuvante, mentre in altri predice una scarsa risposta al trattamento stesso.

I due studi con la maggior numerosità campionaria sono quello pubblicato da Edden et al, con una casistica di 152 casi, e quello di Chang et al su 130 casi: in entrambi non si dimostra alcuna correlazione tra espressione di p53 e gli outcomes di sopravvivenza. Anche i lavori italiani confermano l'assenza di una significatività statistica, sottolineando però che i casi con altri alti livelli di espressione di p53 nelle biopsie pre trattamento ottengono migliori risposte alla radio chemioterapia preoperatoria. È quindi possibile che l'iperespressione di p53 valutata con immunohistochimica non rifletta lo stato mutazionale che deve essere pertanto valutato con analisi genica.

7.3 Ki-67

Ki-67 è una proteina nucleare associata alla proliferazione cellulare presente solo nelle fasi attive delle ciclo cellulare (G1, S, G2, M). Venne definita da Gerdes e collaboratori nel 1983 (16) nel prototipo di anticorpo monoclonale Ki-67 e solo successivamente si scoprì che l'antigene associato a questo anticorpo era una proteina che non presentava omologia con nessun altro polipeptide noto.

Rappresenta un ottimo marcatore per quantificare la frazione proliferante di una popolazione cellulare e si utilizza principalmente per valutare attraverso metodica immunohistochimica l'attività proliferativa delle cellule neoplastiche. In numerosi tumori solidi l'espressione di Ki-67 è associata con la prognosi.

7.3.a Valore prognostico e predittivo di Ki-67 nel tumore del retto: revisione della letteratura

Nel tumore del retto localmente avanzato numerosi studi hanno valutato il ruolo primitivo di risposta dell'espressione di Ki-67 nella biopsia pretrattamento.

Le prime valutazioni risalgono al 1995, quando veniva dimostrato da Willet et al che la conta mitotica dopo trattamento radiante correlasse con l'espressione di Ki-67 (17).

Negli anni successivi altri studi hanno dimostrato che l'efficacia del trattamento radiante era correlata con alti livelli tumorali di Ki-67 alla diagnosi (18,19).

Nel 2001 Kim et al hanno valutato l'indice-Ki-67 come numero di cellule positive alla colorazione immunohistochimica/1000 cellule. Questa analisi condotta su 23 pazienti hanno mostrato che l'indice-Ki-67 dei pazienti "responder" (pCR + risposta parziale TRG 3-4 sec. Dworak), era significativamente superiore rispetto a quello dei "non responder" ($p=0.029$) (20).

Nel 2002 in un'analisi condotta da Rodel et al su 44 pazienti sottoposti a radio chemioterapia neoadiuvante con 5-Fluorouracile si è evidenziato un trend non significativo tra l'espressione di Ki-67 e la risposta patologica ($p=0.07$) (21).

Rau et al in una pubblicazione del 2003 hanno valutato 66 pazienti sottoposti a chemio radioterapia neoadiuvante con 5-Fluorouracile da sola o in associazione ad ipertermia locoregionale, riscontrando che la differenza di espressione fra biopsia pretrattamento e pezzo operatorio post-trattamento correla con la DFS: un incremento di Ki-67 si associa a migliore DFS rispetto ai pazienti con un decremento di Ki-67 ($p=0.005$) (22).

Jakob et al nel 2008 hanno riscontrato su 22 pazienti che una bassa espressione di Ki-67 nella biopsia pretrattamento è associata ad un maggior grado di regressione tumorale sec. Dworak ($p<0.05$), dato che si conferma nell'analisi multivariata come fattore predittivo indipendente di risposta al trattamento neoadiuvante ($p<0.01$) (23).

Kikuchi et al in uno studio precedentemente citato, hanno valutato diversi fattori biomolecolari, tra cui l'espressione immunohistochimica di Ki-67 in 60 pazienti sottoposti a chemio radioterapia neoadiuvante a base di S1 ed irinotecano, riscontrando una correlazione statisticamente significativa tra elevate espressioni di Ki-67 nella biopsia pretrattamento e maggior grado di regressione tumorale TRG sec. Dworak ($p<0.05$) (24).

7.4 EGFR

Il recettore del fattore di crescita epidermico appartiene alla famiglia dei recettori tirosin-kinasi Erb, comprendente quattro proteine codificate dal protooncogene c-erb B: EGFR o Erb B1, Erb B2 o HER/neu, Erb B3 o HER3 e Erb 4 o HER4. È una glicoproteina di membrana tirosin-kinasica (TK), composta da un dominio extracellulare, un segmento lipofilico transmembrana e un dominio intracellulare con attività protein-kinasica (25). I suoi principali ligandi sono una proteina costituita da 53 amminoacidi nota come fattore di crescita epidermico (EGF) e il fattore di crescita trasformante-alfa (TGF-alfa). Attraverso il legame al dominio extra membrana del recettore, EGF e TGF-alfa attivano la dimerizzazione del recettore stesso con un altro EGFR oppure con un altro membro della famiglia Erb. Entrambe le dimerizzazioni (omo o etero-dimerizzazione) stimolano l'auto-fosforilazione del dominio tirosin-kinasico del recettore, attivando una cascata di segnali intracellulari mirati a proteggere la cellula dall'apoptosi e promuovere l'angiogenesi, la migrazione, l'adesione, la sopravvivenza e la differenziazione cellulare (26). Questa cascata agisce attraverso l'attivazione delle proteine STAT, della proteina AKT e delle kinasi MAP (27) inducendo la trascrizione dei geni coinvolti nella divisione e nella sopravvivenza cellulare. È ormai nota l'attività oncogenetica di questo recettore in molti tipi tumorali compresi quelli gastrointestinali. L'aumentata attività e la sovra espressione di EGFR sembrano essere associate con la progressione tumorale con una peggiore prognosi.

7.4.a Valore prognostico e predittivo di EGFR nel tumore del retto: revisione della letteratura

Una revisione degli studi pubblicati a partire dal 2002 ha evidenziato una mancanza di uniformità, dovuta probabilmente alla variabilità di espressione di EGFR giustificata dai diversi metodi immunostochimici utilizzati per determinarla. L'espressione varia infatti dal 25% all'80% a seconda degli studi. Esiste una significativa variabilità nell'immunoreattività di EGFR in base alla metodologia di fissazione utilizzata e l'intensità della colorazione immunostochimica dei campioni tissutali diminuisce rapidamente dopo due mesi di conservazione dei campioni. Alcuni studi hanno dimostrato che l'immunoreattività di EGFR è maggiore nelle regioni più profonde dei tumori in confronto alle aree superficiali e luminali, evidenza che fa supporre che sia questa reattività ad essere correlata con una diminuzione di sopravvivenza associato all'espressione di EGFR (28).

In un'analisi condotta da Giralt et al nel 2002 l'assenza di iperespressione di EGFR si associa ad un maggior response rate con un trend non significativo ($p=0.07$) che raggiunge la significatività statistica quando si valuta la risposta patologica completa ($p=0.003$) e si mantiene significativo in

multivariata come fattore indipendente predittivo di risposta (29). Lo stesso gruppo ha pubblicato nel 2005 un'analisi su 87 pazienti, in cui dei pazienti con risposta patologica completa il 4% erano EGFR+ e il 23% EGFR- ($p=0.006$). La DSF nei pazienti EGFR+ è risultata significativamente inferiore rispetto quella dei pazienti EGFR-, dato confermato con analisi multivariata. Anche l'intensità di espressione di EGFR aveva un ruolo prognostico: nei pazienti con espressione di EGFR superiore alle 50% la DFS è risultata inferiore ($p < 0.001$) (30).

La casistica di Kim et al ha dimostrato una relazione tra iperespressione di EGFR ed elevato stadio patologico dei T (pT3-T4). L'analisi multivariata ha infatti rilevato come un basso livello di EGFR sia un fattore predittivo indipendente di downstaging ($p=0.012$) (31).

L'analisi di Toiyama et al condotta su 40 biopsie pretrattamento ha mostrato come una bassa espressione di EGFR valutata con RT-PCR è statisticamente correlata con un alto grado di regressione tumorale ($p= 0.013$) e una maggiore DFS ($p=0.003$)

(32). Nel lavoro pubblicato da Azria et al nel 2005, viene valutata l'associazione fra espressione immunohistochimica di EGFR e DFS su 77 pazienti: i pazienti con la diffusa espressione (IHC > 25%) di EGFR avevano una maggiore probabilità ripresentare recidive locali ($p=0.06$) e metastasi a distanza con un trend che non ha raggiunto la significatività statistica. Questi risultati si sono confermati in analisi multivariata, dimostrando il potere prognostico indipendente del grado di estensione dell'espressione di EGFR ($p=0.037$) (33).

7.5 Bcl-2

Il gene anti-apoptotico Bcl-2 localizzato sul cromosoma 18q21 appartiene ad una famiglia di geni che codificano per proteine responsabili della permeabilità della membrana mitocondriale esterna (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP). Alcune proteine come Bcl-2 inibiscono l'apoptosi, mentre altre come bax e bcl-xS la favoriscono.

La proteina Bcl-2 è localizzata sulla membrana mitocondriale esterna, sul reticolo endoplasmatico e sulla membrana nucleare. Una sua inattivazione provoca una cascata enzimatica con attivazione di proteine caspasi che conducono a morte cellulare programmata. Si ritiene che Bcl-2 sia implicata nelle fasi di iniziazione tumorale in quanto la sua sovra espressione porta ad una diminuzione di apoptosi cellulare con maggiore rischio di accumulo di errori all'interno della cellula.

Si presenta infatti precocemente nella sequenza che porta alla trasformazione di adenomi in carcinomi e dai dati riportati in letteratura esiste una stretta correlazione fra questa proteina e la proteina p53: la sovra- espressione di Bcl-2 può inibire l'arresto della crescita cellulare dettato da p53 in seguito ad errori nel genoma cellulare. La valutazione associata di Bcl-2 e p53 sembra

maggiormente accurata rispetto alla singola valutazione di Bcl-2 nei pazienti con carcinoma colon rettale per la complessa interazione nella iniziazione e progressione: infatti Bcl-2 viene inibita da gen bax, a sua volta attivato da p53 nel momento di avvio dell'apoptosi cellulare.

7.5.a Valore prognostico e predittivo di Bcl-2 nel tumore del retto: revisione della letteratura

Numerosi studi hanno valutato questo biomarcatore come potenziale fattore prognostico predittivo di risposta al trattamento chemio radioterapico neoadiuvante nel tumore del retto. In questo setting di pazienti è l'unica analisi che ha mostrato risultati significativi è stata quella condotta da Kudrimoti et al (34)

Gli autori hanno valutato una casistica di 117 pazienti rilevando che il 60% di quelli che avevano ottenuto una risposta patologica completa presentavano positività per Bcl-2 nella biopsia per pretrattamento, rispetto al 16% di coloro che avevano ottenuto una risposta parziale ($p=0.04$). Tutti gli studi su altre casistiche anche più ampie, come quella condotta da Chang et al e la già citata di Kikuchi et al, non hanno rilevato alcun valore prognostico predittivo di Bcl-2.

7.6 INSTABILITA' MICROSATELLITARE (MSI)

I microsatelliti o short tandem repeats (STR), conosciuti anche come simple sequence repeats (SSR) sono sequenze ripetute di DNA non codificante distribuite nel genoma umano e disposte in tandem, utilizzabili come marcatori molecolari di loci. La loro presenza nel genoma umano non influisce per più del 3%, bensì la loro funzione sia essenziale per la struttura dei cromosomi. Queste sequenze sono ad alto rischio di accumulare mutazioni in quanto la DNA polimerasi non si può legare in modo efficiente ad essi durante la sintesi del DNA. Errori più frequenti associati ai microsatelliti sono disallineamenti di basi che sfuggono all'attività intrinseca divisione della DNA polimerasi e le inserzioni-delezioni a loop, che formano forcine di nucleotidi extra-elica. Questi errori si verificano quando il primo nucleotide si disallinea rispetto al filamento di stampo e il rialeallineamento avviene in modo non corretto. Inserzioni o delezioni di microsatelliti in regioni di DNA codificante generano uno slittamento di basi responsabile della formazione di proteine troncate, non funzionanti. Il sistema deputato alla sorveglianza e correzione di errori introdotti dai microsatelliti è noto come Mismatch Repair (MMR), ed è costituito da proteine che interagiscono come eterodimeri, di cui le principali sono: MLH1, MSH2, MSH3, MSH6, PMS2. Quando viene rilevato un mismatch MSH2 si associa con MSH6 o con MSH3.

Mutazioni dei geni deputati al riconoscimento del mismatch portano ad un accumulo di errori nel DNA. Il risultato è una crescita anormale delle cellule, tra cui quelle epiteliali intestinali con maggiore rischio di sviluppo di neoplasie. L'instabilità micro satellitare è associata per il 90% dei casi a mutazioni a carico di MLH1 (35).

Il National Cancer Institute nel 1997 ha raccomandato un pannello di microsatelliti per definire lo stato di MSI (36). Il pannello contiene tre marcatori dinucleotidici (D5S346, D2S123, D17S250) e due marcatori mononucleotidici (BAT25 e BAT26). In accordo con queste linee guida si definisce: MSI-H un tumore con instabilità di due o più marcatori, MSS un tumore senza evidenza di instabilità in nessun marcatore e MSI-L con instabilità di un marcatore. Anche i metodi immunocistochimici di determinazione della perdita di MLH1 e MSH2 per lo studio di MSI si sono dimostrati sensibili e sono diventati una valida alternativa nella pratica clinica. Gli anticorpi anti-MLH1, MSH2, MSH3, MSH6 e PMS2 permettono di valutare la funzionalità del sistema MMR: la mancanza di espressioni di una o più di queste proteine identifica lo status MMR-deficient, in quanto il gene che codifica per quella proteina è probabilmente portatore di una mutazione germinale o è stato inattivato un altro meccanismo.

L'immunocistochimica rappresenta quindi un valido strumento poco costoso e di largo utilizzo per un'iniziale workup del sistema MMR che guida i successivi approfondimenti genetici, da eseguirsi mediante sequenziamento.

I carcinomi con MSI-H si differenziano da quelli MSS in quanto presentano modeste alterazioni del cariotipo, contenuto nucleare di DNA diploide, rare delezioni e rare alterazioni di P53, con una progressione verso la trasformazione maligna che comprende probabilmente tappe diverse da quella classicamente definita per i carcinomi con alterazioni primarie nel gene APC (37).

I tumori con MSI-L hanno un profilo molecolare molto simile a quello dei tumori MSS, per cui molti autori preferiscono inserirli nella medesima categoria. Nell'ambito della recente rivoluzione immunoterapica questa classe di neoplasie merita però una riflessione approfondita per confermare tale supposizione.

L'instabilità microsatellitare si ritrova nel 15% circa dei casi sporadici di cancro del colon retto e rappresenta la principale alterazione genetica (> 95%) nella Sindrome di Lynch. Numerosi studi suggeriscono che la presenza di MSI nei tumori del colon-retto allo stadio II sia un fattore prognostico favorevole rispetto ai tumori in cui è assente, tanto da escludere l'eventuale approccio terapeutico adiuvante.

Nel 2016 viene pubblicata sulla rivista Nature la nuova classificazione molecolare (CSM) comprendente quattro sottotipi di tumore coloretale (CSM1, CSM2, CSM3, CSM4) con le relative implicazioni prognostiche e predittive (38;39).

Tra le quattro classi proposte la CSM1/immune comprende instabilità dei microsatelliti e marcata attivazione immunitaria. La frequenza di quattro tipi di CSM si modifica in base alla sidedness: maggiore a destra per diminuire nel lato sinistro del colon. Nel carcinoma rettale è simile a quella dei carcinomi del colon sinistro, ovvero dalla fessura splenica alla giunzione retto-sigma (CSM 1 8%, CSM2 50%, CMS3 12%, CSM4 30%). La valutazione dell'instabilità dei microsatellitari oggi ha anche ruolo predittivo di risposta all'immunoterapia nel setting metastatico. Infatti in numerosi basket trial la positività per MSI correla con la risposta a trattamenti immunoterapici, agendo da driver molecolare (40).

Sono inoltre in corso diversi trial di fase II per valutare l'impatto in termini di pCR e DFS nel setting neo-adiuvante sia in associazione alla radio-chemioterapia che durante il periodo finestra in attesa della chirurgia (clinical trial.gov).

7.6.a Valore prognostico e predittivo di MSI nel tumore del retto: revisione della letteratura

Numerosi sono gli studi che hanno valutato il ruolo prognostico e predittivo di MSI nel tumore del retto. Nel 2003 veniva pubblicato il lavoro condotto da Rau et al dove si confrontava l'espressione immunoistochimica di MSH2 nella biopsia alla diagnosi e nel pezzo operatorio dopo trattamento neoadiuvante evidenziando un significativo aumento di espressione nel pezzo operatorio a seguito del trattamento neoadiuvante ($p=0.017$). I pazienti con elevata espressione di MSH2 nella biopsia avevano una DFS migliore rispetto ai pazienti con bassa espressione ($p=0.04$). (41)

Successivamente Colombino et al hanno valutato il ruolo prognostico di MSI in 91 pazienti affetti da tumore del retto: nel 19% era presente un fenotipo MSI e questi pazienti hanno mostrato una DFS e OS migliore rispetto al fenotipo MSS, indipendentemente dal trattamento somministrato ($p < 0.001$) (42).

Nella casistica già citata di Bertolini et al, MSI è stata valutata in 91 pazienti sia nella biopsia pretrattamento sia nel pezzo operatorio dopo trattamento neoadiuvante. Il confronto ha mostrato una significativa riduzione della positività di MLH1 e MSH2, inoltre i pazienti MLH1 positivi alla diagnosi hanno avuto una probabilità maggiore di raggiungere la pCR ($p=0.05$) (43).

Importante casistica è anche quella presentata nel lavoro di Samowitz et al, dove il ruolo prognostico di MSI è stato valutato alla diagnosi in 990 pazienti affetti da tumore del retto. In contraddizione con quanto osservato nei tumori del colon e in alcune piccole casistiche di tumori del retto, l'analisi multivariata ha mostrato una riduzione significativa della sopravvivenza dei pazienti con MSI rispetto ai MSS (HR 1.37) (44).

Bao et al nel 2010 hanno pubblicato una casistica di 51 pazienti sottoposti a trattamento neoadiuvante ed hanno confrontato l'espressione immunoistochimica dei geni del sistema MMR nella biopsia diagnostica nel pezzo operatorio dopo trattamento, rilevando una perdita di espressione di MSH6 che non corrisponde a MSI (45). Questo trova giustificazione nelle modificazioni a cui è sottoposto il DNA in corso di trattamento radiante.

Ondrejka et al hanno pubblicato nel 2011 una casistica di 17 casi di tumore del retto localmente avanzato sottoposti a chemioterapia neoadiuvante in cui la ricerca di MSI è stata effettuata con PCR nella biopsia prima del trattamento e nel pezzo operatorio dopo trattamento neoadiuvante, senza evidenziare alcuna modificazione dello stato di instabilità microsatellitare (46).

Nel lavoro pubblicato dal gruppo dell'MD Anderson nel 2016 (47) sono stati analizzati 62 pazienti con MSI trattati dal 1992 al 2012 con approccio multimodale. Il deficit del sistema MMR era dovuto ad alterazioni in MSH2 nel 53% e in MSH6 nel 23%.

Con un follow-up mediano di 6.8 anni, la sopravvivenza cancro specifica a cinque anni è risultata del 100% nello stadio I e II, 85. 1% nello stadio III, 60% nello stadio IV. Il tasso di risposta patologica completa è risultato del 27. 6%, vicino al range più alto che troviamo in letteratura (8-50%). Gli autori concludono affermando che la presenza di MSI correla con un eccellente prognosi ed elevato tasso di risposta patologica completa. (47).

8. IL PROGETTO DI RICERCA, LA SUA REALIZZAZIONE, I RISULTATI OTTENUTI

I fattori biomolecolari nel tumore del retto localmente avanzato (LARC) non hanno un ruolo validato e seppur ampiamente studiati non è confermato se il loro impatto sul tasso di recidiva e sulla sopravvivenza sia statisticamente significativo. Ciò trova giustificazione in parte nelle numerose ma piccole casistiche presenti in letteratura, dove la disomogeneità del campione, dei trattamenti prescritti e delle tecniche immuno-istochimiche adottate non consentono di ottenere una validazione internazionale.

Il nostro progetto di ricerca nasce nel 2015 con la finalità di valutare l'impatto prognostico e predittivo di fattori biomolecolari espressi nella neoplasia alla diagnosi quali: TS, p53, Ki67, EGFR, Bcl-2, MSI, su una casistica retrospettiva ed eventuale validazione del dato su casistica prospettica, qualora statisticamente significativa.

La fase iniziale del progetto di dottorato, espletata nel corso del primo e secondo anno di dottorato, è consistita nella revisione di un'ampia casistica interna all'Ambulatorio per il trattamento multidisciplinare dei tumori ano-rettali, presente nel Policlinico Sant'Orsola Malpighi dal 2001 e composto da un team di oncologi, radioterapisti, chirurghi addominali ai quali nel tempo si sono integrati radiologi e gastroenterologi.

Sono stati analizzati 149 casi di LARC sotto il profilo clinico, diagnostico, istologico, molecolare e terapeutico, seguiti dal 2002 al 2018 con un follow-up mediano di 71, 5 mesi (range 2-181 mesi). Le analisi immunoistochimiche erano già in nostro possesso per precedenti approfondimenti eseguiti sulla biopsia diagnostica e successivamente sul pezzo operatorio post trattamento chemio-radioterapico presso l'Anatomia e Istologia Patologica diretta dal Prof.re Martinelli, successivamente dal Prof.re Grigioni e oggi sotto la guida della Prof.ssa D'Errico.

Nel corso del secondo anno abbiamo proceduto al recupero del dato precedentemente esaminato relativo all'espressione delle proteine MLH1 e MSH2. E' stata eseguita successiva codifica in termini di assenza/presenza di instabilità microsatellitare. Questa scelta è stata guidata in parte dalle informazioni già note in letteratura, in parte enfatizzata dai recenti dati circa l'impatto dell'instabilità microsatellitare sul trattamento metastatico del tumore del colon-retto, giocando il ruolo di driver molecolare per l'utilizzo di immunoterapia. La documentazione esistente in formato cartaceo è stata convertita in dati fruibili per archiviazione informatizzata ed estrapolazione statistica.

Una prima revisione dei dati ha evidenziato alcuni bias relativi ai diversi trattamenti chemioterapici eseguiti sia nella fase neo-adiuvante che adjuvante, a differenti schedule radioterapiche e dose complessiva erogata, caratterizzazione molecolare talvolta incompleta o del tutto assente. Si è deciso quindi di rendere più omogenea la popolazione in oggetto e di concentrare la nostra ricerca sul ruolo prognostico e predittivo di risposta al trattamento multimodale dei biomarcatori identificati.

8.1 MATERIALI E METODI

8.1.1 CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI

La popolazione analizzata ha compreso 149 pazienti dei quali 100 sono stati giudicati idonei in termini di omogeneità del campione in relazione alle caratteristiche analizzate, di cui 64 maschi e 36 femmine con età mediana di 66 anni (range 34-84).

La stadiazione di malattia è stata eseguita in tutti i pazienti con esplorazione digitale, rettoscopia, ecografia endorettale, TC T/A con mdc. La RM pelvica senza mezzo di contrasto è stata performata solo in 35 pazienti, in relazione alla accessibilità e alle indicazioni della metodica negli anni valutati.

La stadiazione clinica del tumore primitivo ha identificato: cT2 3 pazienti, cT3 81 pazienti, cT4 16 pazienti. L'interessamento linfonodale (c anyTN+) ha riguardato 61 pazienti, mentre il sottogruppo linfonodi negativi è risultato omogeneo per il cT: 39 pazienti cT3N0. Questo sottogruppo è stato oggetto di riflessioni statistiche specifiche che però non hanno prodotto alcun dato significativo in termini prognostici e predittivi.

La distanza dal margine anale esterno (mae) è risultata essere: < 6 cm in 12 pazienti, compresa tra 6-12 cm in 78 pazienti, pertanto nella maggior parte nel setting analizzato si riscontrava una localizzazione al retto medio.

Circa il trattamento radio-chemioterapico concomitante neoadjuvante, i regimi chemioterapici eseguiti sono stati: mono-chemioterapia (5-Fluorouracile 225 mg/mq/die i.c. con pompa elastomerica/capecitabina 825 mg/mq/bid/die continuativamente) in 44 pazienti, in associazione a oxaliplatino ev (schedula settimanale) in 54 pazienti.

Due pazienti hanno eseguito trattamento con solo oxaliplatino ev per comorbidità cardiologiche che controindicavano l'utilizzo di fluorofolati/fluoropirimidine.

Il trattamento radiante ha raggiunto la dose cumulativa oggi considerata standard di 5040 cGy in 68 pazienti, 25 pazienti hanno ricevuto una dose compresa tra 4500 e 5040 cGy, 24 pazienti un dosaggio pari a 4500 cGy in associazione a boost pre-pianificato ed erogato a fine trattamento sull'area tumorale residua, mentre solo in 3 pazienti il dosaggio è risultato inferiore a 4500 cGy.

Tutti i pazienti hanno terminato il trattamento multimodale pianificato e sono stati sottoposti a ristadiazione clinico radiologica e discussione multidisciplinare per definizione della successiva procedura chirurgica programmata entro 6-10 settimane dal termine dello stesso. Una resezione anteriore di retto completa di escissione totale del mesoretto (TME), confezionamento di colo/ileo-stomia di protezione è stata performata in 67 pazienti, 27 pazienti sono stati sottoposti ad amputazione addomino-perineale sec. Miles completa di TME e confezionamento di colostomia definitiva.

Una resezione secondo la tecnica di Hartman è stata eseguita in 4 pazienti, mentre 2 pazienti sono stati sottoposti ad escissione trans- anale per comodità che impedivano la procedura standard.

La stadiazione patologica di T è la seguente: yp T0 in 14 pazienti, yp T1 in 11 pazienti, yp T2 in 28 pazienti, yp T3 in 44 pazienti, yp T4 in 3 pazienti.

La stadiazione patologica di N è la seguente: assenza di linfonodi metastatici yp N0 in 69 pazienti, presenza di metastasi linfonodali in 27 pazienti, di cui yp N1 in 16 pazienti e yp N2 in 11 pazienti, mentre in 4 pazienti il dato è risultato mancante nella refertazione anatomopatologica.

Secondo la classificazione attualmente in uso yp UICC Stage (2006) il setting di pazienti in esame è risultato così stratificato: risposta patologica completa in 14 pazienti, stadio 1 in 32 pazienti, stadio 2A in 24 pazienti, stadio 2B in 2 pazienti, stadio 3A in 6 pazienti, stadio 3B in 15 pazienti, stadio 3C in 7 pazienti.

Il grado di regressione tumorale (TRG) è stato valutato secondo diverse classificazioni come specificato nel capitolo dedicato e in accordo a quanto presente in letteratura codificato in: mancata regressione (TRG 1) in 1 paziente, regressione minima ((TRG 2) in 22 pazienti, regressione moderata (TRG3) in 34 pazienti, regressione buona (TRG 4) in 26 pazienti, regressione totale o risposta patologica completa (TRG 5) in 14 pazienti. Il dato è risultato mancante in 3 casi.

Applicando una semplificazione delle categorie di risposta al trattamento neo-adiuvante tenendo conto del TRG, abbiamo suddiviso i pazienti good responders (TRG 3-5 buona risposta) e poor responders (TRG 1-2 scarsa risposta): su 97 pazienti valutabili risultano rispettivamente 40 pazienti good responders e 57 poor responders.

In merito ai margini chirurgici/presenza di residui tumorali, nel 99% dei casi è stata ottenuta una resezione R0, solo in un caso si è verificata una infiltrazione a meno di un 1 mm dal margine di resezione distale (R1).

Il margine circonfrenziale (CRM) è risultato positivo in 10 su 97 pazienti valutabili.

Una chemioterapia adiuvante è stata effettuata in 78 pazienti. In particolare 69 pazienti hanno ricevuto una mono-chemioterapia secondo regime De Gramont (5Fluorouracile i.c. in associazione ad acido folinico ev) o capecitabina (dosaggio standard 1000 mg/mq/bid 1-14 q 21 gg) , 6 pazienti una doppietta contenente 5fluorouracile/capecitabina in associazione ad oxaliplatino (regime Folfox/Xelox), 3 pazienti hanno invece ricevuto una doppietta contenente 5fluorouracile in associazione ad irinotecano (regime FOLFIRI) per precedenti trattamenti eseguiti che controindicavano l'utilizzo di oxaliplatino.

Dopo un follow-up mediano di 71.5 mesi con ultimo aggiornamento della casistica effettuato a marzo 2018 (range 2-181 mesi), si è osservata una ripresa di malattia in 19 pazienti, di cui 3 recidive locali e 16 riprese di malattia a distanza (polmone, fegato, linfonodi retroperitoneali, carcinosi peritoneale). Si sono osservati 16 casi di seconde neoplasie. Un caso di triplice neoplasia con contestuale riscontro di MSI-H.

I decessi accertati sono stati 24, di cui 16 cancro del retto correlati e 8 seconda neoplasia insorta correlati. (Tabella n.1).

8.2 ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA

La descrizione della procedura di immunocolorazione fa strettamente riferimento al protocollo vigente nel periodo storico in cui le analisi vennero condotte (1). Era previsto l'invio presso la U.O di Anatomia e Istologia Patologica del pezzo operatorio entro un arco temporale di 15 minuti, mentre per la biopsia questa veniva immediatamente immersa in fissativo ed inviata entro la mattinata dove veniva lasciata in fissativo per un massimo di sei ore e quindi processata. Dopo l'arrivo del pezzo operatorio, il moncone intestinale ancora chiuso veniva aperto dal patologo e immerso in una soluzione al 4% di aldeide formica (formalina). Trascorso il tempo di fissazione (24-48 ore) si procedeva al prelievo della neoplasia e quindi alla processazione dei tessuti in inclusore automatico. I prelievi venivano inclusi in paraffina. Dal blocchetto in paraffina corrispondente alla parte centrale della neoplasia (punto di massima infiltrazione) si ottenevano sezioni seriate dello spessore di 4 um, che venivano raccolte su appositi vetrini porta oggetto precaricati (SuperFrost PLUS, Mnezel, Germania) onde evitare il distacco durante la procedura immunoistochimica. I preparati così ottenuti venivano poi asciugati una notte in stufa a 37 C.

Successivamente, le sezioni venivano processate per la colorazione immunoistochimica secondo la tempistica descritta. I tessuti venivano paraffinati con la sequenza: xilitolo (due cambi per 16 minuti); alcool etilico assoluto (tre cambi per 3 minuti ciascuno). Le sezioni venivano quindi

trattate con una soluzione allo 0.5% di acqua ossigenata in metanolo per inibire le perossidasi endogene.

Dopo lavaggio ripetuto e acqua distillata, le sezioni sono state trattate con vari sistemi di recupero dell'antigenicità a seconda degli anticorpi utilizzati. Le sezioni immunocolorate per P53, Ki-67, MLH1, MSH2 e Bcl-2 erano immerse per 40 minuti in tampone citrato pH 6,0 a 98 C, mentre per le sezioni immunocolorate per anticorpo anti-TS si è utilizzato un tampone Tris-EDTA pH 9,0 per 20 minuti a 98 C. Quindi dopo 20 minuti di raffreddamento a temperatura ambiente venivano immerse in PBS (tampone fosfato salino) e quindi trattate con il relativo anticorpo: anti-p53 (clone BP53-12, Novocasta Lab., England); anti-Ki-67 (clone MIB-1, BioGenex Lab., USA); anti-hMLH1 (CLONE G168-15, PharMingen, USA); anti-hMSH2 (clone FE11, Invitrogen, USA); anti-Bcl.2 (clone 100, BioGenex Lab., USA), anti-TS (clone 106/4H4B1, Zymed Laboratoires, USA).

Le sezioni immunocolorate con anticorpo anti-EGFR (clone BioGenex Lab., USA) sono state sottoposte a digestione enzimatica mediante soluzione di proteasi XIV a 37C per 5 minuti. Le sezioni sono state poi lavate in acqua distillata, immersi in PBS, quindi ricoperte con il relativo anticorpo. L'incubazione con degli anticorpi specifici procedeva fino al mattino successivo in camera umida. Le sezioni venivano quindi lavate in PBS e trattate con il sistema di rilevazione Novolink (Novocasta Lab., UK) seguendo le indicazioni della ditta produttrice. La reazione veniva poi evidenziata immergendo le sezioni in una soluzione di acqua ossigenata e diaminobenzidina tetraidrocloruro. La reazione specifica diveniva visibile al microscopio ottico sotto forma di colorazione marrone. Le sezioni venivano quindi lavati in PBS in acqua distillata, colorate con ematossilina, per evidenziarne la morfologia, e quindi disidratate e montate con resina Bio-Mount.

8.2.1 VALUTAZIONE DELLA IMMUNOCOLORAZIONE

La positività per questi marcatori veniva espressa come percentuale di popolazione neoplastica positiva rispetto all'intera popolazione neoplastica valutata. La immunocolorazione per Bcl-2 e EGFR è stata valutata considerando positive le cellule neoplastiche con rispettivamente positività citoplasmatica (Bcl-2) o citoplasmatica e di membrana (EGFR).

Per Bcl-2 I casi sono stati classificati in base al valore di cut-off del 50% della popolazione neoplastica positiva definendo così tre classi: non espresso (0%), basso (< 50%), alto (>50%). La categorizzazione è stata di quattro classi per EGFR: non espresso (0%), poco espresso (1-29%), mediamente espresso (30-59%), fortemente espresso (60-100%), seppur all'epoca delle indagini veniva utilizzato il valore di cut-off dell'1%, valore definito per classificare come positivi o negativi i casi di carcinoma colon-rettale mediante il test predittivo di terapia EGFR PHarmDX. Sono state

invece considerate positive per p53, Ki-67 e TS quelle cellule neoplastiche che presentavano colorazione nucleare. Si sono definite quattro categorie di espressione per p53 e TS: non espresso (0%), poco espresso (1-29%), mediamente espresso (30-59%), fortemente espresso (60-100%). Ki-67 è stata invece valutata come variabile continua e pertanto non categorizzabile.

Infine per identificare quei casi con espressione di elevata instabilità micro satellitare (MSI-H) è stata estrapolato il dato dell'espressione di due proteine del miss-match repair (MMR) che all'epoca venivano considerate in tal senso, ovvero hMLH1 e hMSH2. In termini di refertazione immunoistochimica si definisce oggi la presenza di instabilità micro satellitare la perdita pressoché totale espressione delle proteine hMLH1, hMSH2, hMSH6 e PMS2. L'espressione di hMLH1 e hMSH2 è stata categorizzata utilizzando il valore di cut-off dell'1%, identificando quindi i casi hMLH1/hMSH2 negativi come quelli aventi < 1% di cellule immunopositive. Sono risultati quattro casi di instabilità microsatellitare.

8.3 ANALISI STATISTICA

La metodologia statistica applicata alla popolazione in oggetto ha previsto analisi univariata, bivariata Pearson Chi Square e regressione lineare.

L'analisi statistica dei dati è stata condotta utilizzando il software IBM SPSS Statistics.

Le fasi dell'analisi statistica condotta hanno compreso:

- analisi univariata: analisi descrittiva delle variabili e delle mutabili statistiche osservate con grafici e distribuzioni di frequenza assoluta, relativa e in percentuale; indici di tendenza centrale (media) e di posizione (mediana e moda);
- analisi bivariata: esplorativa e confermativa delle variabili e mutabili statistiche osservate con grafici, indici di correlazione, modelli di regressione e indici di associazione;
- analisi multipla e multivariata: esplorativa e confermativa delle variabili e mutabili osservate con particolare riguardo alle variabili risposta patologica completa (pCR), sopravvivenza libera da malattia (DFS) e sopravvivenza globale (OS);
- verifica di ipotesi: applicazione di test parametrici per le variabili statistiche e di test non parametrici per le mutabili, con livelli di significatività riscontrati pari a: 0,01 ; 0,05.
- analisi della sopravvivenza: è stato applicato il metodo di COX , mediante il quale è possibile individuare più modelli di regressione non parametrica dei fattori predittivi e prognostici e non rispetto all'evento decesso, mentre con il metodo Kaplan-Meier è stato possibile individuare una funzione di sopravvivenza considerando i singoli fattori significativi e non (log-rank test).

8.4 RISULTATI

Dall'analisi statistica non sono emerse associazioni significative tra espressione dei fattori biomolecolari rispetto agli indici predittivi e prognostici di risposta esaminati quali la risposta patologica completa (pCR), tempo libero di ripresa di malattia (DFS), sopravvivenza globale (OS). (Tabella n.2)

Rispetto alle altre variabili esaminate, in particolare interessamento linfonodale alla diagnosi (cTany N+), risposta al trattamento chemio-radioterapico (nCRT), e coinvolgimento linfonodale patologico (pN) è stata riscontrata una associazione con la risposta patologica completa. (Tabella n.3; n.4).

Lo studio dell'analisi di correlazione bivariata tra le variabili statistiche KI-67 e OS, è risultato significativo a 0,05 con l'indice di correlazione lineare pari a 0,23 (tendenza grafica crescente: riconducibile al crescere dei valori di entrambe le variabili), è ed stato approfondito con due modelli di regressione:

- modello n. 1 di regressione lineare tra la variabile dipendente OS da KI-67 (indipendente);
- modello n. 2 di regressione lineare tra la variabile dipendente KI-67 da OS (indipendente).

In termini di correlazione statistica sussiste quindi un'interdipendenza tra le due variabili, che nello specifico può essere interpretata come $OS = F(KI-67)$ con una funzione lineare interpolante nonché descrittiva dei valori osservati, mentre clinicamente come "causa ed effetto". All'aumentare del valore di Ki-67, interpretata come variabile continua, aumenta il tasso di sopravvivenza globale.

Un'altra correlazione bivariata risultata significativa a 0,01 e 0,05 è quella tra le variabili OS e DFS (esprese entrambe in mesi) con l'indice di correlazione lineare pari a 0,969 (tendenza grafica crescente: riconducibile al crescere dei valori di entrambe le variabili). Ciò trova ovviamente una corrispondenza clinica, in quanto all'aumentare del tempo libero da ripresa di malattia aumenta proporzionalmente anche la sopravvivenza globale, (Grafici 1,2).

Dall'analisi della sopravvivenza con metodo Kaplan Meier log-rank test, posta come variabile dipendente l'evento decesso (D) è emerso che il coinvolgimento del margine circonfrenziale incide sulla mortalità ($p=0,001$), mentre il trattamento chemioterapico adiuvante impatta sulla sopravvivenza in maniera statisticamente significativa ($p=0,886$) (Tabella n.9; n.10; grafico n. 2).

La regressione secondo metodo Cox ha invece evidenziato due fattori biomolecolari, quali EGFR e Bcl-2 espressi nella biopsia pre-trattamento, quali variabili indipendenti e quindi predittive rispetto

all'evento decesso (Tabella n.8).

Da una ulteriore regressione multipla, poste come variabili dipendenti DFS e OS nei rispettivi modelli sia completo sia ridotto e quali variabili indipendenti l'interessamento linfonodale alla diagnosi, la localizzazione in cm tumorale rispetto al margine anale esterno, il regime di chemioterapia neo-adiuvante, la risposta al trattamento neo-adiuvante, l'interessamento del margine circonfrenziale, l'interessamento patologico linfonodale, la risposta patologica completa e il regime di chemioterapia adiuvante, sono risultate significative cioè predittive per DFS o OS nel modello ridotto due variabili: l'aver fatto un trattamento chemioterapico adiuvante indipendentemente dal regime e l'interessamento o meno linfonodale iniziale (Tabella n.9).

In conclusione non è stato possibile perseguire l'obiettivo iniziale del progetto di ricerca che prevedeva la creazione di un nomogramma predittivo di risposta al trattamento radio chemioterapico nei pazienti affetti da tumore del retto localmente avanzato. Sono state confermate numerose associazioni e correlazioni statistiche (Tabella n.5; n.6; n.7; 9;11) e la loro ricaduta clinica in accordo con quanto presente in letteratura su casistiche più ampie, a conferma di un'adeguata gestione multidisciplinare dei casi trattati.

8.5 CONCLUSIONI

Il nostro studio ha valutato l'espressione immunoistochimica di TS, p53, EGFR, Ki-67, Bcl-2, MLH1, MSH2, sulla biopsia diagnostica prima del trattamento chemio radioterapico neoadiuvante in pazienti affetti da tumore del retto localmente avanzato, al fine di individuarne il potenziale valore prognostico e predittivo.

In letteratura sono presenti dati provenienti da piccole casistiche che hanno valutato questi biomarcatori spesso singolarmente, con metodiche eterogenee ed analizzato i dati talvolta con criteri dissimili alla ricerca di un significato prognostico e predittivo, nel tentativo di individuare delle categorie di pazienti a diversa prognosi per personalizzare il trattamento.

Alcuni elementi clinici ed anatomopatologici come lo stadio alla diagnosi, lo stadio patologico, lo stato del margine circonfrenziale, il grado di regressione tumorale, l'entità della risposta patologica completa rappresentano fattori prognostici validati da ampi studi presenti letteratura e sono stati in parte confermati anche dalla nostra casistica.

Circa l'instabilità microsatellitare nella nostra casistica quattro pazienti alla diagnosi mostravano un immunofenotipo compatibile con MSI: 1 paziente in stadio II e 3 pazienti in stadio III, di cui due caratterizzati dalla perdita di espressione di hMLH1 e gli altri due dalla perdita di espressione di hMSH2.

Il campione è assolutamente esiguo per trarre conclusioni vicine al recente lavoro pubblicato da De Rosa et al , ma è sicuramente un parametro che deve essere oggi valutato sia per eventuali indicazioni terapeutiche nel setting metastatico che per una valutazione precoce al fine di selezionare i pazienti candidati protocolli di studio che prevedono l'utilizzo di immunoterapia in associazione e/o al termine della trattamento radioterapico in attesa della chirurgia. In questa direzione, è attesa a breve l'apertura dello studio italiano multicentrico di fase II Avana, al quale parteciperà anche il nostro centro selezionato per il volume e per l'alta specialità per patologia.

Seppure in maniera disomogenea, tanto da non aver consentito un confronto tra il pre e il post trattamento, i fattori biomolecolari erano stati analizzati anche sul pezzo operatorio dopo il trattamento multimodale. Abbiamo verificato la perdita di espressione di hMSH2 in altri quattro pazienti, ai quali non è stato eseguito sequenziamento genico di conferma di presenza di MSI-H, in quanto riteniamo che questa perdita non rifletta un reale stato di MSI, quanto più una modificazione conseguente al danno cellulare indotto dal trattamento radiante come già riportato in letteratura da Bao et al.

Dalla revisione della nostra casistica non abbiamo ottenuto un risultato statisticamente significativo in termini di predittività e prognosi da associare all'espressione di uno o più biomarcatori.

Il processo di indagine ci ha consentito più volte di interrogarci e di confrontarci con le più recenti pubblicazioni in materia. Il percorso della personalizzazione del trattamento del tumore del retto localmente avanzato è complesso e carente di risposte univoche, ma lo scenario che si sta delineando necessita sempre più dell'integrazione di dati clinici, radiologici, biologici, molecolari, outcome oncologici, radioterapici, chirurgici e l'elaborazione mediante softwares probabilistici che possano identificare categorie di rischio sulle quali modulare il percorso terapeutico (2;3;4).

Con tale obiettivo è attualmente in corso la valutazione di gene expression profiling mediante metodica Next Generation Sequencing (NGS) utilizzando il pannello genico Ion AmpliSeq Colon and Lung Cancer Research Panel v2. La popolazione in oggetto è costituita da 20 pazienti inclusi nella casistica retrospettiva, di cui 10 pazienti positivi per risposta patologica completa rispetto al gruppo controllo con scarsa risposta al trattamento. La risposta patologica completa è infatti un evento che apre differenti scenari clinici e terapeutici, che potrebbero essere pre-pianificati qualora si identificasse una signature genica specifica.

Se riflettiamo su alcuni importanti traguardi ottenuti in oncologia come ad esempio il trattamento integrato del tumore dell'ano, questi non sempre sono stati risultato di studi comparativi o di analisi molecolari pre-pianificate, bensì il frutto di osservazione ed intuizione scientifica. Gli strumenti oggi a nostra disposizione sono così potenti e precisi che è nostro compito tentare e ritentare,

modificare il percorso intellettuale di ricerca tutte le volte che questo si renda necessario, rincorrendo un modello trasparente e riproducibile di ricerca clinica, che metta il paziente e la sua patologia al centro dei nostri sforzi.

Con questa mission continueremo a ricercare e a collaborare nell'ambito di questa complessa e sempre più multidisciplinare patologia oncologica, avendo ben chiaro che l'obiettivo non è necessariamente il raggiungimento di un risultato ma lo sviluppo di strumenti che possano aiutarci a meglio comprendere i meccanismi molecolari e di resistenza.

9. BIBLIOGRAFIA

Capitolo 1

1. Linee guida Aiom Neoplasie del retto e ano Edizione 2017
2. Associazione Italiana Registri Tumori, I numeri del cancro AIRTUM 2017-2018
<http://www.registri-tumori.it/cms>
3. Carlotta Buzzoni, Emanuele Crocetti, Roberta De Angelis, Luigino Dal Maso, AIRTUM Working Group. Cancer survival in Italy in 2000-2007 is better than in Europe Epidemiol Prev 2015; 39 (4): 270-270

Capitolo 2

1. Napoleon B, Pujol B, Berger F et al. Accuracy of endosonography in the staging of rectal cancer treated by radiotherapy. Br J Surg 1991; 78: 785-788
2. Fiona G.M. Taylor, Philip Quirke et al. Preoperative Magnetic Resonance Imaging Assessment of Circumferential Resection Margin Predicts Disease-Free Survival and Local Recurrence: 5-Year Follow-Up Results of the MERCURY Study. J Clin Oncol 2013 32:34-43.
3. Van der Paardt MP, Zagers MB, Beets-Tan RG et al. Patients who undergo preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer restaged by using diagnostic MR imaging: a systematic review and meta-analysis. Radiology 2013;269(1):101-112.
4. European Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology (ESGAR) 2017
<https://www.esgar.org/guidelines-publications/published-consensus-statements-guidelines/>
5. Beets-Tan RG, Lambregts DM, Maas M, et al. Magnetic resonance imaging for the clinical management of rectal cancer patients: recommendations from the 2012 European Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology (ESGAR) consensus meeting. Eur Radiol 2013; 23(9): 2522-2531.
6. Doenja M. J. Lambregts, Miriam M. van Heeswijk, Andrea Delli Pizzi, Regina G. H. Beets-Tan et al. Diffusion-weighted MRI to assess response to chemoradiotherapy in rectal cancer: main interpretation pitfalls and their use for teaching. Eur Radiol (2017) 27:4445–4454 DOI 10.1007/s00330-017-4830-z.
7. R. Glynn-Jones, L. Wyrwicz, E. Tiret et al. Rectal Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. Ann Oncol (2017) 28 (suppl 4): iv22–iv40
8. Chand M, Siddiqui MR, Swift I, Brown G. Systematic review of prognostic importance of extramural venous invasion in rectal cancer. World J Gastroenterol 2016;22:1721-1726.
9. Al-Sukhni E, Milot L, Fruitman M, et al. Diagnostic accuracy of MRI for assessment of T category, lymph node metastases, and circumferential resection margin involvement in patients with rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. Ann Surg Oncol. 2012;19(7):2212-23.
10. Zhang G, Cai YZ, Xu GH. Diagnostic Accuracy of MRI for Assessment of T Category and Circumferential Resection Margin Involvement in Patients With Rectal Cancer: A Meta-Analysis. Dis Colon Rectum. 2016;59(8):789-799.

Capitolo 3

1. Swedish Rectal Cancer Trial: Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. *N Engl J Med* 1997, 336:980-987.
2. Sauer R, Becker H, Hohenberger W et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 1731-1740
3. Gérard JP, Conroy T, Bonnetain F et al. Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: results of FFCO 9203. *J Clin Oncol*. 2006 Oct 1;24(28):4620-5.
4. Bosset JF, Collette L, Calais G et al. Chemotherapy with Preoperative Radiotherapy in Rectal Cancer. *N Engl J Med* 2006;355:1114-23.
5. Aschele C, Cionini L, Lonardi S et al. Primary tumor response to preoperative chemoradiation with or without oxaliplatin in locally advanced rectal cancer: pathologic results of the STAR-01 randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2011, 29: 2773-2780.
6. Engels B, al dPe. Preoperative radiotherapy with a simultaneous boost compared to chemoradiotherapy for T3-T4 rectal cancer: interim analysis of a multicentric randomised trial. 56 th ASTRO Annual meeting. San Francisco 2014.
7. Burbach JP, den Harder AM, Intven M et al. Impact of radiotherapy boost on pathological complete response in patients with locally advanced rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Radiother Oncol* 2014; 113: 1
8. Picardi V, Deodato F, Guido A et al. Concurrent Chemoradiation with Concomitant Boost in Locally Advanced **Rectal Cancer**: A Phase II Study. *Anticancer Res*. 2016 Aug;36(8):4081-7.
9. Ngan SY, Burmeister B, Fisher RJ et al. Randomized trial of short-course radiotherapy versus long-course chemoradiation comparing rates of local recurrence in patients with T3 rectal cancer: Trans-Tasman Radiation Oncology Group trial 01.04. *J Clin Oncol* 2012, 30: 3827-3833.
10. Bujko K, Nowacki MP, Nasierowska-Guttmejer A, et al: Long-term results of a randomized trial comparing preoperative short-course radiotherapy with preoperative conventionally fractionated chemoradiation for rectal cancer. *Br J Surg* 93:1215-1223, 2006.
11. Erlandsson J., Holm T., Pettersson D. et al. Optimal fractionation of preoperative radiotherapy and timing to surgery for rectal cancer (Stockholm III): a multicentre, randomised, non-blinded, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol*. 2017 Mar;18(3):336-346.7
12. Krzysztof Bujko et al. Neoadjuvant chemoradiation for fixed cT3 or cT4 rectal cancer: Results of a Polish II multicentre phase III study. *J Clin Oncol* 34, 2016 (suppl 4S; abstr 489).
13. Wolmark N¹, Wieand HS, Hyams DM et al. Randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy with or without radiotherapy for carcinoma of the rectum: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol R-02. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Mar 1;92(5):388-96.
14. **Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C et al; German Rectal Cancer Study Group. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. N Engl J Med. 2004 Oct 21;351(17):1731-40.**
15. Bosset JF, Calais G, Mineur L et al. Fluorouracil-based adjuvant chemotherapy after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer: long-term results of the EORTC 22921 randomised study. *Lancet Oncol* 2014; 15: 184–90.

16. Hofheinz RD, Wenz F, Post S et al. Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: a randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012, 13: 579-588.
17. O'Connell MJ, Colangelo LH, Beart RW et al. Capecitabine and oxaliplatin in the preoperative multimodality treatment of **rectal cancer**: surgical end points from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project trial R-04. *J Clin Oncol*. 2014 Jun 20;32(18):1927-34. doi: 10.1200/JCO.2013.53.7753. Epub 2014 May 5.
18. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, et al. Neoadjuvant 5-FU or Capecitabine plus radiation with or without Oxaliplatin in rectal cancer patients: a phase III randomized clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 2015, 107(11): djv248
19. Aschele et al. Final results of STAR-01: A randomized phase III trial comparing preoperative chemoradiation with or without oxaliplatin in locally advanced rectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 34, no. 15_suppl (May 2016) 3521-3521.

Capitolo 4

1. Güenaga KF, Lustosa SAS, Saad SS, Saconato H, Matos D. Ileostomy or colostomy for temporary decompression of colorectal anastomosis (review). *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007, *Acta Cir Bras*. 2008 May- Jun;23(3):294-303.
2. ASCRS and WOCN joint position statement on the value of pre-operative stoma marking for patients undergoing fecal ostomy surgery. *J Wound Ostomy Continence Nurs*. 2007; 34:627–628).
3. Hindenburg T, and Rosenberg J Closing a temporary ileostomy within two weeks *Dan Med Bul* 2010;57(6):A4157.
4. Alves A, Oanis Y, Lelong B, et al. Randomized clinical trial of early *versus* delayed temporary stoma closure after proctectomy *British Journal of Surgery* 2008; 95: 693–698).
5. Bonjer HJ, Deijen CL, Abis GA, et al. A randomized trial of laparoscopic versus open surgery for rectal cancer. *N Engl J Med* 2015; 372:1324-1332.
6. Jeong SY, Park JW, Nam BH, et al. Open versus laparoscopic surgery for mid-rectal or low-rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy (COREAN trial): survival outcomes of an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2014; 15:767-774.
7. Fleshman J, Branda M, Sargent DJ, et al. Effect of laparoscopic-assisted resection vs open resection of stage II or III rectal cancer on pathologic outcomes: the ACOSOG Z6051 randomized clinical trial. *JAMA* 2015; 314:1346-1355.
8. Archampong D, Borowski D, Wille-Jørgensen P, Iversen LH. Workload and surgeon´s specialty for outcome after colorectal cancer surgery. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2012, Issue 3. Art. No.: CD005391
9. **Rottoli** M, Hanna L, Kukreja N et al. Is transanal total mesorectal excision a reproducible and oncologically adequate technique? A pilot study in a single center. *Int J Colorectal Dis*. 2016 Feb;31(2):359 -63. Epub 2015 Oct 21.
10. Habr-Gama A, Sabbaga J, Gama-Rodrigues J et al. Watch and **wait** approach following extended neoadjuvant chemoradiation for distal **rectal cancer**: are we getting closer to anal **cancer** management? *Dis Colon Rectum*. 2013 Oct;56(10):1109-17. doi: 10.1097/DCR.0b013e3182a25c4e.
11. Van der Valk M., Whatch-and-Wait Database Consortium, oral session ASCO GI 2017).

Capitolo 5

1. Quirke P, Steele R, Monson J et al. Effect of the plane of surgery achieved on local recurrence in patients with operable rectal cancer: a prospective study using data from the MRC CR07 and NCIC–CTG CO16 randomised clinical trial. *Lancet* 2009;373:821–828.
2. Garcia–Granero E, Faiz O, Munoz E, Flor B, Navarro S, Faus C et al. Macroscopic assessment of mesorectal excision in rectal cancer: a useful tool for improving quality control in a multidisciplinary team. *Cancer* 2009;115:3400–3411
3. Leite JS, Martins SC, Oliveira J, Cunha MF, Castro–Sousa F. Clinical significance of macroscopic completeness of mesorectal resection in rectal cancer. *Colorectal Dis* 2011; 13:381–386.
4. Maslekar S, Sharma A, Macdonald A, et al. Mesorectal grades predict recurrences after curative resection for rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2007; 50:168–175.
5. Nagtegaal ID, Marijnen CA, Kranenbarg EK, et al. Circumferential Margin Involvement Is Still an Important Predictor of Local Recurrence in Rectal Carcinoma: Not One Millimeter but Two Millimeters Is the Limit.. *Am J Surg Pathol.* 2002 Mar;26(3):350-7.
6. Caricato M, Borzomati D, Ausania F, Valeri S, Rosignoli A, Coppola R. Prognostic factors after surgery for locally recurrent rectal cancer: an overview. *Eur J Surg Oncol.* 2006;32:126–132..
7. Rodel C, Martus P, Papadoupoulos T et al. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23; 8688–8696
8. Janjan NA, Crane C, Feig BW, et al: Improved overall survival among responders to preoperative chemoradiation for locally advanced rectal cancer. *Am J Clin Oncol* 24:107-112, 2001
9. Park SY et al. Is step section necessary for determination of complete pathological response in rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy? *Histopathology.* 2011;59(4):650-9 .
10. Martin ST, Heneghan HM, Winter DC. Systematic review and meta-analysis of outcomes following pathological complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer. *Br J Surg.* 2012 Jul;99(7):918-28
11. Maas M, Nelemans PJ, Valentini V, et al. Long-term outcome in patients with a pathological complete response after chemoradiation for rectal cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2010;11: 835–844.
12. Stipa F, Chessin DB, Shia J, et al. A pathologic complete response of rectal cancer to preoperative combined- modality therapy results in improved oncological outcome compared with those who achieve no downstaging on the basis of preoperative endorectal ultrasonography. *Ann Surg Oncol.* 2006;13:1047–53.
13. de Campos-Lobato LF, Stocchi L, da Luz Moreira A et al. Pathologic complete response after neoadjuvant treatment for rectal cancer decreases distant recurrence and could eradicate local recurrence. *Ann Surg Oncol.* 2011 Jun;18(6):1590-8.
14. Nagtegaal I et al. Tumor Deposits in Colorectal Cancer: Improving the Value of Modern Staging—A Systematic Review and Meta-Analysis. DOI: 10.1200/JCO.2016.68.9091 *Journal of Clinical Oncology* 35, no. 10 (April 2017) 1119-1127.

Capitolo 6

1. Capirci C, Valentini V, Cionini L et al. Prognostic value of pathologic complete response after neoadjuvant therapy in locally advanced rectal cancer: long-term analysis of 566 ypCR patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008 Sep 1;72(1):99-107. doi: 10.1016/j.ijrobp.2007.12.019. Epub 2008 Apr 11.
2. Maas M, Nelemans PJ, Valentini V et al. Long-term outcome in patients with a pathological complete response after chemoradiation for rectal cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2010 Sep;11(9):835-44. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70172-8. Epub 2010 Aug 6.
3. Gunderson LL, Sargent DJ, Tepper JE et al. Impact of T and N stage and treatment on survival and relapse in adjuvant rectal cancer: a pooled analysis.. *J Clin Oncol.* 2004 May 15;22(10):1785-96. Epub 2004 Apr 5.
4. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. Quasar Collaborative Group, Gray R, Barnwell J, McConkey C, Hills RK, Williams NS, Kerr DJ. *Lancet.* 2007 Dec 15;370(9604):2020-9.
5. Collette L, Bosset JF, den Dulk M ET AL. European Organisation for Research and Treatment of Cancer Radiation Oncology Group. Patients with curative resection of cT3-4 rectal cancer after preoperative radiotherapy or radiochemotherapy: does anybody benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy? A trial of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Radiation Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2007 Oct 1;25(28):4379-86.
6. Hong YS, Nam BH, Jung KH, JL L. Adjuvant chemotherapy with oxaliplatin/5-fluorouracil/leucovorin (FOLFOX) versus 5-fluorouracil/leucovorin (FL) in patients with locally advanced rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy followed by surgery: A randomized phase II study (The ADORE). *Lancet Oncol* 2014; 15: 1245–53.
7. Valentini V, van Stiphout RG, Lammering G et al. Nomograms for predicting local recurrence, distant metastases, and overall survival for patients with locally advanced rectal cancer on the basis of European randomized clinical trials. *J Clin Oncol* 2011, 29: 3163-3172.
8. Sauer R, Becker H, Hohenberger W et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 1731-1740
9. Fernandez-Martos C., Pericay C, Aparicio J. Et al. Phase II, Randomized Study of Concomitant Chemoradiotherapy Followed by Surgery and Adjuvant Capecitabine Plus Oxaliplatin (CAPOX) Compared With Induction CAPOX Followed by Concomitant Chemoradiotherapy and Surgery in Magnetic Resonance Imaging–Defined, Locally Advanced Rectal Cancer: Grupo Cáncer de Recto 3 Study. *J Clin Oncol* 2010. 28:859-865.
10. Neofirinox on going trial (NCT0180479). Phase III Study Comparing Preoperative Chemoradiotherapy Alone Versus Neoadjuvant Chemotherapy With Folfirinox Regimen Followed by Preoperative Chemoradiotherapy for Patients With Resectable Locally Advanced Rectal Cancer (Néofirinox)

Capitolo 7

1. Dayde D, Tanaka I, Jain R et al. Predictive and Prognostic Molecular Biomarkers for Response to Neoadjuvant Chemoradiation in Rectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017 Mar 7;18(3). pii: E573. doi: 10.3390/ijms18030573.
2. Informazioni contenute e verificate nell'ambito della tesi di specializzazione aa 2010/2011

- “Biomarcatori prognostici e predittivi nel trattamento del tumore del retto localmente avanzato” discussa dalla Dott.ssa Pini S., con la quale è stata condivisa parte della revisione della letteratura a partire dal 2001.
3. Salonga D, Danenberg KD, Johnson M. et al. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res.* 2000 Apr;6(4):1322-7.
 4. Saw RP, Morgan M, Koorey D. et al. p53, deleted in colorectal cancer gene, and thymidylate synthase as predictors of histopathologic response and survival in low, locally advanced rectal cancer treated with preoperative adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum.* 2003 Feb;46(2):192-202.
 5. Jakob C, Liersch T, Meyer W. Et al. Immunohistochemical analysis of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase, and dihydropyrimidine dehydrogenase in rectal cancer (cUICC II/III): correlation with histopathologic tumor regression after 5-fluorouracil-based long-term neoadjuvant chemoradiotherapy. *Am J Surg Pathol.* 2005 Oct;29(10):1304-9.
 6. Jakob C, Liersch T, Meyer W et al. Prognostic value of histologic tumor regression, thymidylate synthase, thymidine phosphorylase, and dihydropyrimidine dehydrogenase in rectal cancer UICC Stage II/III after neoadjuvant chemoradiotherapy. *Am J Surg Pathol.* 2006 Sep;30(9):1169-74. Erratum in: *Am J Surg Pathol.* 2006 Nov;30(11):1489.
 7. Liersch T, Langer C, Ghadimi BM. et al. Lymph node status and TS gene expression are prognostic markers in stage II/III rectal cancer after neoadjuvant fluorouracil-based chemoradiotherapy. *J Clin Oncol.* 2006 Sep 1;24(25):4062-8.
 8. Negri FV¹, Campanini N, Camisa R. et al. Biological predictive factors in rectal cancer treated with preoperative radiotherapy or radiochemotherapy. *Br J Cancer.* 2008 Jan 15;98(1):143-7. Epub 2007 Dec 18.
 9. Kikuchi M¹, Mikami T, Sato T et al. High Ki67, Bax, and thymidylate synthase expression well correlates with response to chemoradiation therapy in locally advanced rectal cancers: proposal of a logistic model for prediction. *Br J Cancer.* 2009 Jul 7;101(1):116-23. doi: 10.1038/sj.bjc.6605105. Epub 2009 Jun 2.
 10. Páez D, Paré L, Altés A, Sancho-Poch FJ et al. Thymidylate synthase germline polymorphisms in rectal cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy based on 5-fluorouracil. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010 Nov;136(11):1681-9. doi: 10.1007/s00432-010-0826-7. Epub 2010 Feb 18.
 11. Conradi LC, Bleckmann A, Schirmer M et al. Thymidylate synthase as a prognostic biomarker for locally advanced rectal cancer after multimodal treatment. *Ann Surg Oncol.* 2011 Sep;18(9):2442-52. doi: 10.1245/s10434-011-1608-4. Epub 2011 Feb 23.
 12. Tanaka K, Saigusa S, Toiyama Y et al. TS and DPD mRNA levels on formalin-fixed paraffin-embedded specimens as predictors for distant recurrence of rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *J Surg Oncol.* 2012 May;105(6):529-34. doi: 10.1002/jso.22123. Epub 2011 Oct 17.
 13. Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV et al. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Aug 15;89(16):7491-5.
 14. Lowe SW¹, Rulley HE, Jacks T. et al. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell.* 1993 Sep 24;74(6):957-67.
 15. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW et al. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature.* 1993 Apr 29;362(6423):847-9.
 16. McIlwraith AJ, Vasey PA, Ross GM et al. Cell cycle arrests and radiosensitivity of human tumor cell lines: dependence on wild-type p53 for radiosensitivity. *Cancer Res.* 1994 Jul 15;54(14):3718-22.

17. Gerdes J, Lemke H, Baisch H et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984 Oct;133(4):1710-5.
18. Willett CG, Warland G, Coen J et al. Rectal cancer: the influence of tumor proliferation on response to preoperative irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995 Apr 30;32(1):
19. Nakano T, Oka K, Ishikawa A et al. Correlation of cervical carcinoma c-erb B-2 oncogene with cell proliferation parameters in patients treated with radiation therapy for cervical carcinoma. *Cancer.* 1997 Feb 1;79(3):513-20.
20. Raybaud-Diogène H, Fortin A, Morency R et al. Markers of radioresistance in squamous cell carcinomas of the head and neck: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *J Clin Oncol.* 1997 Mar;15(3):1030-8.
21. Kim NK, Park JK, Lee KY et al. p53, BCL-2, and Ki-67 expression according to tumor response after concurrent chemoradiotherapy for advanced rectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2001 Jun;8(5):418-24.
22. Rödel F, Hoffmann J, Grabenbauer GG et al. High survivin expression is associated with reduced apoptosis in rectal cancer and may predict disease-free survival after preoperative radiochemotherapy and surgical resection. *Strahlenther Onkol.* 2002 Aug;178(8):426-35.
23. Rau B, Sturm I, Lage H et al. Dynamic expression profile of p21WAF1/CIP1 and Ki-67 predicts survival in rectal carcinoma treated with preoperative radiochemotherapy. *J Clin Oncol.* 2003 Sep 15;21(18):3391-401. Epub 2003 Jul 28. Erratum in: *J Clin Oncol.* 2004 Feb 1;22(3):576.
24. Jakob C, Liersch T, Meyer W et al. Predictive value of Ki67 and p53 in locally advanced rectal cancer: correlation with thymidylate synthase and histopathological tumor regression after neoadjuvant 5-FU-based chemoradiotherapy. *World J Gastroenterol.* 2008 Feb 21;14(7):1060-6.
25. Kikuchi M¹, Mikami T, Sato T et al. High Ki67, Bax, and thymidylate synthase expression well correlates with response to chemoradiation therapy in locally advanced rectal cancers: proposal of a logistic model for prediction. *Br J Cancer.* 2009 Jul 7;101(1):116-23. doi: 10.1038/sj.bjc.6605105. Epub 2009 Jun 2.
26. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 1990 May 15;265(14):7709-12. Review. No abstract available.
27. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Feb;2(2):127-37. Review.
28. Bowman T, Garcia R, Turkson J et al. STATs in oncogenesis. *Oncogene.* 2000 May 15;19(21):2474-88. Review.
29. Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer.* 2001 Sep 1;92(5):1331-46.
30. Giralt J, Eraso A, Armengol M et al. Epidermal growth factor receptor is a predictor of tumor response in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002 Dec 1;54(5):1460-5.
31. Giralt J¹, de las Heras M, Cerezo L, Grupo Español de Investigacion Clinica en Oncologia Radioterápica (GICOR). The expression of epidermal growth factor receptor results in a worse prognosis for patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy: a multicenter, retrospective analysis. *Radiother Oncol.* 2005 Feb;74(2):101-8.
32. Kim JS, Kim JM, Li S et al. Epidermal growth factor receptor as a predictor of tumor downstaging in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006 Sep 1;66(1):195-200. Epub 2006 Jul 12.
33. Toiyama Y, Inoue Y, Saigusa S et al. Gene expression profiles of epidermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 with special

- reference to local responsiveness to neoadjuvant chemoradiotherapy and disease recurrence after rectal cancer surgery. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2010 May;22(4):272-80. doi: 10.1016/j.clon.2010.01.001. Epub 2010 Feb 1.
34. Azria D, Bibeau F, Barbier N et al. Prognostic impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression on loco-regional recurrence after preoperative radiotherapy in rectal cancer. *BMC Cancer*. 2005 Jun 20;5:62.
 35. Kudrimoti M, Lee EY, Kang Y et al. Genetic markers predictive of response to induction chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancers. *J Ky Med Assoc*. 2007 Jan;105(1):18-22.
 36. Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res*. 1998 Apr 15;58(8):1713-8.
 37. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998 Nov 15;58(22):5248-57. Review.
 38. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P et al. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology*. 1993 May;104(5):1535-49. Review.
 39. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012 Jul 18;487(7407):330-7. doi: 10.1038/nature11252.
 40. Komor MA, Bosch LJ, Bounova Gand NGS-ProToCol Consortium. Consensus molecular subtype classification of colorectal adenomas. *J Pathol*. 2018 Jul 3. doi: 10.1002/path.5129.
 41. Stein A, Folprecht G. Immunotherapy of Colon Cancer. *Oncol Res Treat*. 2018;41(5):282-285. doi: 10.1159/000488918. Epub 2018 Apr 26.
 42. Rau B, Sturm I, Lage H et al. Dynamic expression profile of p21WAF1/CIP1 and Ki-67 predicts survival in rectal carcinoma treated with preoperative radiochemotherapy. *J Clin Oncol*. 2003 Sep 15;21(18):3391-401. Epub 2003 Jul 28. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2004 Feb 1;22(3):576.
 43. Colombino M¹, Cossu A, Manca A et al. Prevalence and prognostic role of microsatellite instability in patients with rectal carcinoma. *Ann Oncol*. 2002 Sep;13(9):1447-53.
 44. Bertolini F, Bengala C, Losi L et al. Prognostic and predictive value of baseline and posttreatment molecular marker expression in locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007 Aug 1;68(5):1455-61. Epub 2007 Apr 18.
 45. Samowitz WS, Curtin K, Wolff RK et al. Microsatellite instability and survival in rectal cancer. *Cancer Causes Control*. 2009 Nov;20(9):1763-8. doi: 10.1007/s10552-009-9410-3. Epub 2009 Aug 11.
 46. Bao F, Panarelli NC, Rennert H. et al. Neoadjuvant therapy induces loss of MSH6 expression in colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2010 Dec;34(12):1798-804. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181f906cc.
 47. Hong SP¹, Min BS, Kim TI et al. The differential impact of microsatellite instability as a marker of prognosis and tumour response between colon cancer and rectal cancer. *Eur J Cancer*. 2012 May;48(8):1235-43. doi: 10.1016/j.ejca.2011.10.005. Epub 2011 Nov 7.
 48. Nicole de Rosa, Miguel A. Rodriguez-Bigas, George J. Chang et al. DNA Mismatch Repair Deficiency in Rectal Cancer: Benchmarking Its Impact on Prognosis, Neoadjuvant Response Prediction, and Clinical Cancer Genetics. *J Clin Oncol*. 2016 Sep 1; 34(25): 3039–3046. Published online 2016 Jul 1

Capitolo 8

1. Informazioni contenute e verificate nell'ambito della tesi di specializzazione aa 2010/2011 "Biomarcatori prognostici e predittivi nel trattamento del tumore del retto localmente avanzato" discussa dalla Dott.ssa Pini S., con la quale è stata condivisa parte della documentazione storica della casistica in oggetto e la descrizione delle tecniche di laboratorio.
2. 1. Hur H, Kim NK, Min BS et al. Can a biomarker-based scoring system predict pathologic complete response after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer? *Dis Colon Rectum*. 2014 May; 57(5):592-601. doi: 10.1097/DCR.000000000000109.
3. Nam Kyu Kim, Hyuk Hur. New Perspectives on Predictive Biomarkers of Tumor Response and Their Clinical Application in Preoperative Chemoradiation Therapy for Rectal Cancer. *Yonsei Med J*. 2015 Nov 1; 56(6): 1461–1477. Published online 2015 Sep 25. doi: 10.3349/ymj.2015.56.6.1461
4. Marisa D Santos, Cristina Silva, Anabela Rocha et al. Predictive clinical model of tumor response after chemoradiation in rectal cancer. *Oncotarget*. 2017 Aug 29; 8(35): 58133–58151. Published online 2017 Jul 28. doi: 10.18632/oncotarget.19651

11. APPENDICE

PARAMETRI PRE-OPERATORI	N. PZ
ETA (anni)	
MEDIA	66
MEDIANA	67.5
RANGE	34-84
SESSO	
UOMINI	64
DONNE	36
DISTANZA DEL TUMORE DAL MAE (cm)	
0-6	12
>6-12	78
>12-16	0
cT stage	
T2	3
T3	81
T4	16
cN stage	
N positivi	61
N negativi	39
cT3N0	39
any cT N+	61
STADIAZIONE CLINICA COMPLETA (RSCS, EUS, RM, TC T/A con mdc)	35
RM non eseguita (2004-2008)	65
TRATTAMENTO CHEMIORADIOTERAPICO NEO-ADJ	
Mono CT (5FU/capecitabina) + LC RT	44
Mono CT (oxaliplatino) + LC RT	2
Doppietta CT (5FU/capecitabina + oxa) + LC RT	54
DOSAGGIO EROGATO RT	
5040 Gy	68
> 4500-5040 Gy	5
4500 Gy + boost	24
< 4500 Gy	3
PROCEDURA CHIRURGICA	
RESEZIONE ANTERIORE	67
RESEZIONE ADDOMINOPERINEALE sec. Miles	27
RESEZIONE SECONDO HARTMANN	4
ESCISSIONE TRANS ANALE	2
PARAMETRI POST-OPERATORI	N. PZ
R0	99
R1	1
R2	0
CRM negativo	87
CRM positivo	10
CRM non valutabile	3
GRADO DI REGRESSIONE TUMORALE (TRG)	
0 mancata regressione	1

1 regressione minima (fibrosi < 25% della massa)	22
2 regressione moderata (< 50%)	34
3 regressione buona (< 80%)	26
4 regressione totale/pCR	14
data missing	3
yp T stage	
0	14
1	11
2	28
3	44
4	3
yp N stage	
0	69
1	16
2	11
yp N data missing (TAE)	4
yp UICC stage (2006)	
0/PCR	14
1	32
2A	24
2B	2
3A	6
3B	15
3C	7
4	0
TRATTAMENTO CHEMIOTERAPICO ADIUVANTE	N. PZ
SI	78
NO	22
MONOCHEMIOTERAPIA (5fu/capecitabina)	69
DOPPIETTA (5FU/capecitabina + oxa)	6
DOPPIETTA (Folfiri)	3
FOLLOW-UP (ultimo aggiornamento marzo 2018)	
RANGE	2-181 mesi
MEDIA	71.5 mesi
RECIDIVA DI MALATTIA	
SI	19
LOCALE	3
A DISTANZA	16
LOCALIZZAZIONE DELLE METASTASI	
POLMONE	6
FEGATO	3
LINFONODI	1
PELVI/PERITONEO	4
MULTIORGANO	2
SECONDE NEOPLASIE	16
MORTE CANCRO DEL RETTO-CORRELATA	16
MORTE SECONDA NEOPLASIA-CORRELATA	8

Tabella n. 1: Caratteristiche della casistica retrospettiva esaminata

FATTORI CLINICO-ANATOMOPATOLOGICI	pCR
cTanyN+	p=0,133
pN	p=0.016
nCRT	p=0,000

Tab. n. 2 Associazioni statisticamente significative in relazione alla risposta patologica completa

FATTORI CLINICO-ANATOMOPATOLOGICI	TRG
cTanyN+	p=0,000
CRM	p= 0,021

Tab. n. 3 Associazioni statisticamente significative in relazione al grado patologico di risposta

FATTORI BIOMOLECOLARI	pCR	DFS	OS
TS	p=0,839	p=0,749	p=0,648
P 53	p=0,624	p=0,831	p=0,352
Ki-67	p=0,556	p=0,525	p=0,350
EGFR	p=0,370	p=0,388	p=0,255
Bcl-2	p=0,449	p=0,399	p=0,530
MSI	p=0,742	p=0,797	p=0,408

Tab. n 4 Associazione tra fattori biomolecolari e indici di risposta/sopravvivenza

FATTORI CLINICO-ANATOMO-PATOLOGICI	DFS	OS
cTany N+	p=0,754	p=0,692
nCRT	p=0,064	p= 0,567
pCR	p=0,415	p=0,202
CRM	p=0,856	p=0,454
TRG	p=0,018	p=0,155
pN	p=0,749	p=0,525

Tab. n. 5 Associazione tra parametri clinico-anatomopatologici e indici di sopravvivenza

	cTanyN+
pN	p=0,000
nCRT	p=0,000
pCR	p=0,133
TRG	p=0,000
DFS	p=0,754
OS	p=0,692

Tab. n. 6. Associazione tra coinvolgimento clinico linfonodale basale e parametri di risposta

	CRM
pN	p=0,009
nCRT	p=0,520
pCR	p=0,179
TRG	p=0,021
DFS	p=0,856
OS	p=0,454

Tab. n. 7. Associazione tra margine circonfenziale e parametri di risposta

EGFR	p= 0,026
TS	p= 0,145
KI-67	p= 0,664
P 53	p= 0,735
Bcl-2	p= 0,045
MSI	p= 0,073
DFS	p= 0,001
OS	p= 0,04

Tab. n. 8 Regressione con modello di Cox: viene riportato il dato della significatività rispetto alla funzione eseguita in cui sono state prese in considerazione tutte le variabili indicate

	Log-rank test
CRM	p=0,001
pCR	p=0,728
pT	p=0,015
CT adiuvante	p=0.886
Cm dal m.a.e.	p=0,405

Tab. n. 9 Analisi della sopravvivenza con metodo Kaplan Meier Log-rank test, posta come variabile dipendente l'evento decesso (D)

	Log-rank test
Bcl-2	p=0,381
EGFR	p=0,134
KI-67	p=0,000
MSI	p=0,159
P53	p=0,865
TS	p=0,130

Tab. n. 10 Analisi della sopravvivenza con metodo Kaplan Meier log-rank test, posta come variabile dipendente l'evento decesso (D)

Kaplan-Meier Variabile dipendente: Data inizio CRT Evento: decesso (Si)	Predittori(j,k)	
	DFS log-rank test p	OS log-rank test p
Predittori (i)		
Distanza dal margine anale (> 6 cm vs ≤ 6 cm)	0.000394	0.000239
cT2-T3 vs cT4	0.000404	0.000138
cTanyN0 vs cTanyN+	0.00032	0,000176
ypN0 vs ypN+	0.000211	0,0000966
Buona risposta vs scarsa risposta ((TRG3-4 vs TRG 1-2) al trattamento neoadiuvante (nCRT)	0.000411	0.000213
pCR si vs no	0.000406	0.000213
CRM negativo vs CRM positivo	0,0000368	0,0000197
Tipo di chemioterapia neoadiuvante (mono CT vs doppietta contenente oxaliplatino)	0.000115	0,0000503
Chemioterapia adiuvante eseguita vs non eseguita	0.000417	0.000215

Tab. n. 11. Analisi della sopravvivenza con metodo Kaplan Meier log-rank test, posta come variabile dipendente l'inizio del trattamento chemioterapico e l'evento decesso (D).

Regressione multipla

Modello completo

```
. mvreg OS = Adjcod_A RISPATC0 CRMcod_A pNcod CTcod_A cTcod cTanyN_A, noconst
> ant
```

Equation	Obs	Parms	RMSE	"R-sq"	F	P
OS	98	7	46.40166	0.6924	29.26018	0.0000

OS	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
Adjcod_A	46.40981	9.096813	5.10	0.000	28.34011 64.47951
RISPATC0	13.0143	13.69681	0.95	0.345	-14.19273 40.22134
CRMcod_A	-12.23034	16.53971	-0.74	0.462	-45.08444 20.62376
pNcod	6.282578	10.66168	0.59	0.557	-14.89555 27.4607
CTcod_A	11.71269	9.225717	1.27	0.207	-6.613062 30.03844
cTcod	-5.362998	14.01772	-0.38	0.703	-33.20747 22.48147
cTanyN_A	28.42133	9.972216	2.85	0.005	8.612745 48.22991

Modello ridotto alle sole variabili significative

```
. mvreg OS = Adjcod_A cTanyN_A, noconstant
```

Equation	Obs	Parms	RMSE	"R-sq"	F	P
OS	98	2	46.23125	0.6779	101.003	0.0000

OS	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
Adjcod_A	55.19725	7.669783	7.20	0.000	39.97285 70.42165
cTanyN_A	27.15229	8.744898	3.10	0.003	9.793809 44.51078

1. Kaplan-Meier: evento localizzazione del tumore primitivo espresso come cm dal (m.a.e), rispetto a OS e data inizio nCRT

La popolazione è stata categorizzata in due gruppi: 0= tumore > 6 cm dal mae; 1= tumore ≤ 6 cm dal mae.

Case Processing Summary					
OS	Total N	N of Events	Censored		
			N	Percent	
2	1	0	1	100,0%	
4	2	1	1	50,0%	
9	3	2	1	33,3%	
10	1	0	1	100,0%	
11	1	0	1	100,0%	
12	1	1	0	0,0%	
14	1	1	0	0,0%	
17	1	1	0	0,0%	
21	1	1	0	0,0%	
23	1	1	0	0,0%	
24	1	0	1	100,0%	
28	1	1	0	0,0%	
30	1	1	0	0,0%	
34	2	1	1	50,0%	
35	1	1	0	0,0%	
36	1	1	0	0,0%	
37	2	2	0	0,0%	
39	2	1	1	50,0%	
40	1	1	0	0,0%	
41	1	0	1	100,0%	
42	1	0	1	100,0%	
45	1	0	1	100,0%	
48	1	1	0	0,0%	
50	1	0	1	100,0%	
51	1	1	0	0,0%	
52	2	0	2	100,0%	
56	1	1	0	0,0%	
60	2	2	0	0,0%	
61	2	2	0	0,0%	
63	1	1	0	0,0%	
65	2	1	1	50,0%	
71	1	0	1	100,0%	
72	2	1	1	50,0%	
73	1	0	1	100,0%	
76	2	1	1	50,0%	
77	1	1	0	0,0%	
78	2	0	2	100,0%	
79	1	1	0	0,0%	
80	1	1	0	0,0%	
81	1	0	1	100,0%	
82	1	1	0	0,0%	
84	1	1	0	0,0%	
86	2	1	1	50,0%	
88	2	2	0	0,0%	
90	1	0	1	100,0%	
92	2	2	0	0,0%	
93	1	0	1	100,0%	
94	1	1	0	0,0%	
95	2	0	2	100,0%	
97	2	0	2	100,0%	
99	1	1	0	0,0%	
100	4	2	2	50,0%	
103	1	1	0	0,0%	
104	2	1	1	50,0%	
105	2	2	0	0,0%	
106	1	0	1	100,0%	
107	1	1	0	0,0%	
110	1	0	1	100,0%	
111	1	0	1	100,0%	
112	1	0	1	100,0%	
113	1	0	1	100,0%	
114	1	0	1	100,0%	
115	2	2	0	0,0%	
116	1	1	0	0,0%	
117	1	1	0	0,0%	
119	2	2	0	0,0%	
125	1	1	0	0,0%	
128	1	0	1	100,0%	
132	1	1	0	0,0%	
139	1	1	0	0,0%	
181	1	1	0	0,0%	
Overall	96	57	39	40,6%	

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	157,397	70	0,000

Test of equality of survival distributions for the different levels of OS.

2. Kaplan-Meier: evento risposta al trattamento neoadiuvante (nCRT) rispetto a OS e data inizio nCRT

La popolazione è stata categorizzata in due gruppi in relazione alla risposta patologica ottenuta: 0= TRG 3-4 BUONA RISPOSTA; 1= TRG 1-2 SCARSA RISPOSTA

Case Processing Summary					
OS	Total N	N of Events	Censored		
			N	Percent	
2	1	0	1	100,0%	
4	2	1	1	50,0%	
9	3	2	1	33,3%	
10	1	0	1	100,0%	
11	1	1	0	0,0%	
12	1	0	1	100,0%	
14	1	1	0	0,0%	
17	1	1	0	0,0%	
21	1	1	0	0,0%	
23	1	0	1	100,0%	
24	1	1	0	0,0%	
28	1	1	0	0,0%	
30	1	0	1	100,0%	
33	1	0	1	100,0%	
34	2	1	1	50,0%	
35	1	1	0	0,0%	
36	1	0	1	100,0%	
37	2	2	0	0,0%	
39	1	1	0	0,0%	
40	1	0	1	100,0%	
41	1	1	0	0,0%	
42	1	1	0	0,0%	
45	1	0	1	100,0%	
48	1	1	0	0,0%	
50	1	1	0	0,0%	
51	1	1	0	0,0%	
52	1	1	0	0,0%	
56	1	0	1	100,0%	
60	2	0	2	100,0%	
61	1	1	0	0,0%	
65	2	0	2	100,0%	
71	1	0	1	100,0%	
72	2	1	1	50,0%	
73	1	1	0	0,0%	
76	2	0	2	100,0%	
77	1	1	0	0,0%	
78	2	1	1	50,0%	
79	1	1	0	0,0%	
80	1	0	1	100,0%	
81	1	1	0	0,0%	
82	2	2	0	0,0%	
84	1	1	0	0,0%	
86	2	1	1	50,0%	
88	2	0	2	100,0%	
90	1	1	0	0,0%	
92	2	2	0	0,0%	
93	1	1	0	0,0%	
94	1	0	1	100,0%	
95	2	0	2	100,0%	
97	2	2	0	0,0%	
99	1	1	0	0,0%	
100	4	2	2	50,0%	
103	1	1	0	0,0%	
104	2	2	0	0,0%	
105	2	2	0	0,0%	
106	1	0	1	100,0%	
107	1	0	1	100,0%	
110	1	1	0	0,0%	
111	1	1	0	0,0%	
112	1	1	0	0,0%	
113	1	1	0	0,0%	
114	1	0	1	100,0%	
115	2	1	1	50,0%	
116	1	0	1	100,0%	
117	1	0	1	100,0%	
119	2	0	2	100,0%	
125	1	1	0	0,0%	
128	1	1	0	0,0%	
132	1	1	0	0,0%	
139	1	1	0	0,0%	
181	1	1	0	0,0%	
Overall	94	55	39	41,5%	

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	174,373	70	0,000

Test of equality of survival distributions for the different levels of OS.

3. Kaplan-Meier: evento interessamento margine circonferenziale (CRM) rispetto al OS e data inizio CRT -
 La popolazione è stata categorizzata in due gruppi: 0= CRM negativo; 1=CRM positivo

Case Processing Summary					
OS	Total N	N of Events	Censored		
			N	Percent	
2	1	1	0	0,0%	
4	2	2	0	0,0%	
9	3	3	0	0,0%	
10	1	1	0	0,0%	
11	1	1	0	0,0%	
12	1	1	0	0,0%	
14	1	1	0	0,0%	
17	1	0	1	100,0%	
21	1	1	0	0,0%	
23	1	1	0	0,0%	
24	1	1	0	0,0%	
28	1	1	0	0,0%	
30	1	1	0	0,0%	
33	1	1	0	0,0%	
34	2	2	0	0,0%	
35	1	0	1	100,0%	
36	1	1	0	0,0%	
37	2	1	1	50,0%	
39	2	2	0	0,0%	
40	1	1	0	0,0%	
41	1	1	0	0,0%	
42	1	1	0	0,0%	
45	1	1	0	0,0%	
48	1	1	0	0,0%	
50	1	1	0	0,0%	
51	1	0	1	100,0%	
52	2	2	0	0,0%	
56	1	1	0	0,0%	
60	2	2	0	0,0%	
61	2	1	1	50,0%	
63	1	0	1	100,0%	
65	2	1	1	50,0%	
71	1	1	0	0,0%	
72	2	1	1	50,0%	
73	1	1	0	0,0%	
76	2	2	0	0,0%	
77	1	1	0	0,0%	
78	2	2	0	0,0%	
79	1	1	0	0,0%	
80	1	1	0	0,0%	
81	1	1	0	0,0%	
82	2	1	1	50,0%	
84	1	1	0	0,0%	
86	2	2	0	0,0%	
88	2	2	0	0,0%	
90	1	1	0	0,0%	
92	2	2	0	0,0%	
93	1	1	0	0,0%	
94	1	1	0	0,0%	
95	2	2	0	0,0%	
97	2	2	0	0,0%	
99	1	1	0	0,0%	
100	4	4	0	0,0%	
103	1	1	0	0,0%	
104	2	2	0	0,0%	
105	2	2	0	0,0%	
106	1	1	0	0,0%	
107	1	0	1	100,0%	
110	1	1	0	0,0%	
111	1	1	0	0,0%	
112	1	1	0	0,0%	
113	1	1	0	0,0%	
114	1	1	0	0,0%	
115	2	2	0	0,0%	
116	1	1	0	0,0%	
117	1	1	0	0,0%	
119	2	2	0	0,0%	
125	1	1	0	0,0%	
128	1	1	0	0,0%	
132	1	1	0	0,0%	
139	1	1	0	0,0%	
181	1	1	0	0,0%	
Overall	98	88	10	10,2%	

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	186,961	71	0,000

Test of equality of survival distributions for the different levels of OS.

4. Kaplan-Meier: evento trattamento chemioterapico adiuvante (Adj) rispetto a OS e data inizio nCRT
 La popolazione è stata categorizzata in due gruppi: 0=eseguita CT Adj; 1= non eseguita CT Adj

Case Processing Summary					
OS	Total N	N of Events	Censored		
			N	Percent	
2	1	0	1	100,0%	
4	2	1	1	50,0%	
9	3	1	2	66,7%	
10	1	1	0	0,0%	
11	1	0	1	100,0%	
12	1	0	1	100,0%	
14	1	0	1	100,0%	
17	1	1	0	0,0%	
21	1	0	1	100,0%	
23	1	0	1	100,0%	
24	1	0	1	100,0%	
28	1	0	1	100,0%	
30	1	1	0	0,0%	
33	1	0	1	100,0%	
34	2	0	2	100,0%	
35	1	0	1	100,0%	
36	1	1	0	0,0%	
37	2	0	2	100,0%	
39	2	0	2	100,0%	
40	1	0	1	100,0%	
41	1	0	1	100,0%	
42	1	0	1	100,0%	
45	1	0	1	100,0%	
48	1	1	0	0,0%	
50	1	0	1	100,0%	
51	1	0	1	100,0%	
52	2	0	2	100,0%	
56	1	1	0	0,0%	
60	2	0	2	100,0%	
61	2	0	2	100,0%	
63	1	1	0	0,0%	
65	2	0	2	100,0%	
71	1	0	1	100,0%	
72	2	1	1	50,0%	
73	1	1	0	0,0%	
76	2	0	2	100,0%	
77	1	0	1	100,0%	
78	2	1	1	50,0%	
79	1	0	1	100,0%	
80	1	0	1	100,0%	
81	1	0	1	100,0%	
82	2	1	1	50,0%	
84	1	0	1	100,0%	
86	2	0	2	100,0%	
88	2	1	1	50,0%	
90	1	0	1	100,0%	
92	2	0	2	100,0%	
93	1	1	0	0,0%	
94	1	1	0	0,0%	
95	2	0	2	100,0%	
97	2	1	1	50,0%	
99	1	0	1	100,0%	
100	4	1	3	75,0%	
103	1	0	1	100,0%	
104	2	0	2	100,0%	
105	2	0	2	100,0%	
106	1	0	1	100,0%	
107	1	0	1	100,0%	
110	1	0	1	100,0%	
111	1	0	1	100,0%	
112	1	0	1	100,0%	
113	1	0	1	100,0%	
114	1	0	1	100,0%	
115	2	1	1	50,0%	
116	1	0	1	100,0%	
117	1	0	1	100,0%	
119	2	0	2	100,0%	
125	1	0	1	100,0%	
128	1	0	1	100,0%	
132	1	0	1	100,0%	
139	1	0	1	100,0%	
181	1	1	0	0,0%	
Overall	98	20	78	79,6%	

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	219,043	71	0,000

Test of equality of survival distributions for the different levels of OS.

5. Kaplan-Meier: evento CT neo-adiuvante contenente o meno oxaliplatino rispetto a OS e data inizio nCRT
 La popolazione è stata categorizzata in due gruppi: 0=CT senza oxa; 1=CT contenente oxa

Case Processing Summary					
OS	Total N	N of Events	Censored		
			N	Percent	
2	1	1	0	0,0%	
4	2	1	1	50,0%	
9	3	2	1	33,3%	
10	1	1	0	0,0%	
11	1	0	1	100,0%	
12	1	0	1	100,0%	
14	1	1	0	0,0%	
17	1	1	0	0,0%	
21	1	0	1	100,0%	
23	1	1	0	0,0%	
24	1	0	1	100,0%	
28	1	0	1	100,0%	
30	1	0	1	100,0%	
33	1	1	0	0,0%	
34	2	0	2	100,0%	
35	1	0	1	100,0%	
36	1	0	1	100,0%	
37	2	1	1	50,0%	
39	2	1	1	50,0%	
40	1	0	1	100,0%	
41	1	0	1	100,0%	
42	1	0	1	100,0%	
45	1	1	0	0,0%	
48	1	1	0	0,0%	
50	1	0	1	100,0%	
51	1	1	0	0,0%	
52	2	1	1	50,0%	
56	1	0	1	100,0%	
60	2	0	2	100,0%	
61	2	2	0	0,0%	
63	1	1	0	0,0%	
65	2	0	2	100,0%	
71	1	0	1	100,0%	
72	2	0	2	100,0%	
73	1	0	1	100,0%	
76	2	0	2	100,0%	
77	1	1	0	0,0%	
78	2	1	1	50,0%	
79	1	1	0	0,0%	
80	1	0	1	100,0%	
81	1	1	0	0,0%	
82	2	2	0	0,0%	
84	1	1	0	0,0%	
86	2	2	0	0,0%	
88	2	1	1	50,0%	
90	1	1	0	0,0%	
92	2	2	0	0,0%	
93	1	1	0	0,0%	
94	1	0	1	100,0%	
95	2	0	2	100,0%	
97	2	2	0	0,0%	
99	1	0	1	100,0%	
100	4	3	1	25,0%	
103	1	1	0	0,0%	
104	2	1	1	50,0%	
105	2	1	1	50,0%	
106	1	0	1	100,0%	
107	1	1	0	0,0%	
110	1	0	1	100,0%	
111	1	0	1	100,0%	
112	1	0	1	100,0%	
113	1	1	0	0,0%	
114	1	0	1	100,0%	
115	2	1	1	50,0%	
116	1	0	1	100,0%	
117	1	0	1	100,0%	
119	2	1	1	50,0%	
125	1	0	1	100,0%	
128	1	0	1	100,0%	
132	1	0	1	100,0%	
139	1	1	0	0,0%	
181	1	1	0	0,0%	
Overall	98	46	52	53,1%	

Overall Comparisons				
	Chi-Square	df	Sig.	
Log Rank (Mantel-Cox)	199,152	71	0,000	

Test of equality of survival distributions for the different levels of OS.

6. Kaplan-Meier: evento estensione del tumore alla diagnosi (cT) rispetto a OS e data inizio nCRT
 La popolazione è stata categorizzata in due gruppi: 0= cT2-3; 1= cT4

Case Processing Summary					
OS	Total N	N of Events	Censored		
			N	Percent	
2	1	1	0	0,0%	
4	2	2	0	0,0%	
9	3	3	0	0,0%	
10	1	0	1	100,0%	
11	1	1	0	0,0%	
12	1	1	0	0,0%	
14	1	1	0	0,0%	
17	1	1	0	0,0%	
21	1	1	0	0,0%	
23	1	1	0	0,0%	
24	1	0	1	100,0%	
28	1	1	0	0,0%	
30	1	0	1	100,0%	
33	1	1	0	0,0%	
34	2	2	0	0,0%	
35	1	1	0	0,0%	
36	1	1	0	0,0%	
37	2	0	2	100,0%	
39	2	2	0	0,0%	
40	1	1	0	0,0%	
41	1	1	0	0,0%	
42	1	1	0	0,0%	
45	1	1	0	0,0%	
48	1	1	0	0,0%	
50	1	0	1	100,0%	
51	1	1	0	0,0%	
52	2	2	0	0,0%	
56	1	1	0	0,0%	
60	2	2	0	0,0%	
61	2	2	0	0,0%	
63	1	1	0	0,0%	
65	2	2	0	0,0%	
71	1	1	0	0,0%	
72	2	1	1	50,0%	
73	1	0	1	100,0%	
76	2	1	1	50,0%	
77	1	1	0	0,0%	
78	2	2	0	0,0%	
79	1	1	0	0,0%	
80	1	1	0	0,0%	
81	1	1	0	0,0%	
82	2	1	1	50,0%	
84	1	1	0	0,0%	
86	2	1	1	50,0%	
88	2	2	0	0,0%	
90	1	1	0	0,0%	
92	2	1	1	50,0%	
93	1	1	0	0,0%	
94	1	1	0	0,0%	
95	2	2	0	0,0%	
97	2	2	0	0,0%	
99	1	1	0	0,0%	
100	4	4	0	0,0%	
103	1	1	0	0,0%	
104	2	2	0	0,0%	
105	2	1	1	50,0%	
106	1	1	0	0,0%	
107	1	0	1	100,0%	
110	1	1	0	0,0%	
111	1	0	1	100,0%	
112	1	1	0	0,0%	
113	1	1	0	0,0%	
114	1	1	0	0,0%	
115	2	2	0	0,0%	
116	1	1	0	0,0%	
117	1	1	0	0,0%	
119	2	2	0	0,0%	
125	1	1	0	0,0%	
128	1	1	0	0,0%	
132	1	1	0	0,0%	
139	1	1	0	0,0%	
181	1	1	0	0,0%	
Overall	98	83	15	15,3%	

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	178,023	71	0,000

Test of equality of survival distributions for the different levels of OS.

7. Kaplan-Meier: evento risposta patologica completa pCR rispetto a OS e data inizio nCRT

La popolazione è stata categorizzata in due gruppi: 0= presente pCR; 1= assente pCR

Case Processing Summary					
OS	Total N	N of Events	Censored		
			N	Percent	
2	1	0	1	100,0%	
4	2	2	0	0,0%	
9	3	3	0	0,0%	
10	1	1	0	0,0%	
11	1	1	0	0,0%	
12	1	0	1	100,0%	
14	1	1	0	0,0%	
17	1	1	0	0,0%	
21	1	1	0	0,0%	
23	1	0	1	100,0%	
24	1	1	0	0,0%	
28	1	1	0	0,0%	
30	1	0	1	100,0%	
33	1	1	0	0,0%	
34	2	2	0	0,0%	
35	1	1	0	0,0%	
36	1	0	1	100,0%	
37	2	2	0	0,0%	
39	2	2	0	0,0%	
40	1	1	0	0,0%	
41	1	1	0	0,0%	
42	1	1	0	0,0%	
45	1	1	0	0,0%	
48	1	1	0	0,0%	
50	1	1	0	0,0%	
51	1	1	0	0,0%	
52	2	2	0	0,0%	
56	1	1	0	0,0%	
60	2	2	0	0,0%	
61	2	2	0	0,0%	
63	1	1	0	0,0%	
65	2	2	0	0,0%	
71	1	1	0	0,0%	
72	2	2	0	0,0%	
73	1	1	0	0,0%	
76	2	1	1	50,0%	
77	1	1	0	0,0%	
78	2	2	0	0,0%	
79	1	1	0	0,0%	
80	1	0	1	100,0%	
81	1	1	0	0,0%	
82	2	2	0	0,0%	
84	1	1	0	0,0%	
86	2	2	0	0,0%	
88	2	1	1	50,0%	
90	1	1	0	0,0%	
92	2	2	0	0,0%	
93	1	1	0	0,0%	
94	1	0	1	100,0%	
95	2	1	1	50,0%	
97	2	2	0	0,0%	
99	1	1	0	0,0%	
100	4	3	1	25,0%	
103	1	1	0	0,0%	
104	2	2	0	0,0%	
105	2	2	0	0,0%	
106	1	0	1	100,0%	
107	1	1	0	0,0%	
110	1	1	0	0,0%	
111	1	1	0	0,0%	
112	1	1	0	0,0%	
113	1	1	0	0,0%	
114	1	1	0	0,0%	
115	2	2	0	0,0%	
116	1	0	1	100,0%	
117	1	0	1	100,0%	
119	2	2	0	0,0%	
125	1	1	0	0,0%	
128	1	1	0	0,0%	
132	1	1	0	0,0%	
139	1	1	0	0,0%	
181	1	1	0	0,0%	
Overall	98	84	14	14,3%	

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	151,285	71	0,000

Test of equality of survival distributions for the different levels of OS.

8. Kaplan-Meier: evento coinvolgimento patologico linfonodale (pN)rispetto a DFS e data inizio nCRT
 La popolazione è stata categorizzata in due gruppi: 0= pN negativo; 1= pN positivo

Case Processing Summary					
OS	Total N	N of Events	Censored		
			N	Percent	
2	1	1	0	0,0%	
4	2	2	0	0,0%	
9	3	1	2	66,7%	
10	1	1	0	0,0%	
11	1	1	0	0,0%	
12	1	1	0	0,0%	
14	1	1	0	0,0%	
17	1	0	1	100,0%	
21	1	1	0	0,0%	
23	1	1	0	0,0%	
24	1	1	0	0,0%	
28	1	1	0	0,0%	
30	1	1	0	0,0%	
33	1	1	0	0,0%	
34	2	1	1	50,0%	
35	1	0	1	100,0%	
36	1	1	0	0,0%	
37	2	0	2	100,0%	
39	2	1	1	50,0%	
40	1	0	1	100,0%	
41	1	1	0	0,0%	
42	1	1	0	0,0%	
45	1	1	0	0,0%	
48	1	1	0	0,0%	
50	1	1	0	0,0%	
51	1	1	0	0,0%	
52	2	1	1	50,0%	
56	1	0	1	100,0%	
60	2	0	2	100,0%	
61	2	1	1	50,0%	
63	1	1	0	0,0%	
65	2	2	0	0,0%	
71	1	1	0	0,0%	
72	2	2	0	0,0%	
73	1	0	1	100,0%	
76	2	2	0	0,0%	
77	1	1	0	0,0%	
78	2	2	0	0,0%	
79	1	1	0	0,0%	
80	1	1	0	0,0%	
81	1	1	0	0,0%	
82	2	0	2	100,0%	
84	1	0	1	100,0%	
86	2	1	1	50,0%	
88	2	2	0	0,0%	
90	1	0	1	100,0%	
92	2	1	1	50,0%	
93	1	0	1	100,0%	
94	1	1	0	0,0%	
95	2	2	0	0,0%	
97	2	1	1	50,0%	
99	1	1	0	0,0%	
100	4	3	1	25,0%	
103	1	1	0	0,0%	
104	2	1	1	50,0%	
105	2	2	0	0,0%	
106	1	1	0	0,0%	
107	1	1	0	0,0%	
110	1	1	0	0,0%	
111	1	1	0	0,0%	
112	1	1	0	0,0%	
113	1	1	0	0,0%	
114	1	1	0	0,0%	
115	2	1	1	50,0%	
116	1	1	0	0,0%	
117	1	1	0	0,0%	
119	2	2	0	0,0%	
125	1	1	0	0,0%	
128	1	1	0	0,0%	
132	1	1	0	0,0%	
139	1	1	0	0,0%	
181	1	1	0	0,0%	
Overall	98	72	26	26,5%	

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	173,161	71	0,000

Test of equality of survival distributions for the different levels of OS.

9. Kaplan-Meier: evento coinvolgimento clinico iniziale linfonodale (cTanyN) rispetto a OS e data inizio nCRT
 La popolazione è stata categorizzata in due gruppi: 0= cTanyN0; 1= cTanyN+

Case Processing Summary					
OS	Total N	N of Events	Censored		
			N	Percent	
2	1	1	0	0,0%	
4	2	1	1	50,0%	
9	3	1	2	66,7%	
10	1	0	1	100,0%	
11	1	1	0	0,0%	
12	1	1	0	0,0%	
14	1	1	0	0,0%	
17	1	0	1	100,0%	
21	1	0	1	100,0%	
23	1	1	0	0,0%	
24	1	0	1	100,0%	
28	1	0	1	100,0%	
30	1	0	1	100,0%	
33	1	1	0	0,0%	
34	2	1	1	50,0%	
35	1	0	1	100,0%	
36	1	0	1	100,0%	
37	2	0	2	100,0%	
39	2	1	1	50,0%	
40	1	1	0	0,0%	
41	1	1	0	0,0%	
42	1	1	0	0,0%	
45	1	1	0	0,0%	
48	1	0	1	100,0%	
50	1	0	1	100,0%	
51	1	0	1	100,0%	
52	2	1	1	50,0%	
56	1	1	0	0,0%	
60	2	0	2	100,0%	
61	2	0	2	100,0%	
63	1	0	1	100,0%	
65	2	0	2	100,0%	
71	1	1	0	0,0%	
72	2	0	2	100,0%	
73	1	0	1	100,0%	
76	2	0	2	100,0%	
77	1	1	0	0,0%	
78	2	1	1	50,0%	
79	1	0	1	100,0%	
80	1	1	0	0,0%	
81	1	1	0	0,0%	
82	2	0	2	100,0%	
84	1	0	1	100,0%	
86	2	1	1	50,0%	
88	2	1	1	50,0%	
90	1	0	1	100,0%	
92	2	0	2	100,0%	
93	1	1	0	0,0%	
94	1	1	0	0,0%	
95	2	1	1	50,0%	
97	2	1	1	50,0%	
99	1	1	0	0,0%	
100	4	2	2	50,0%	
103	1	0	1	100,0%	
104	2	1	1	50,0%	
105	2	1	1	50,0%	
106	1	0	1	100,0%	
107	1	0	1	100,0%	
110	1	0	1	100,0%	
111	1	0	1	100,0%	
112	1	0	1	100,0%	
113	1	1	0	0,0%	
114	1	1	0	0,0%	
115	2	1	1	50,0%	
116	1	1	0	0,0%	
117	1	0	1	100,0%	
119	2	0	2	100,0%	
125	1	1	0	0,0%	
128	1	0	1	100,0%	
132	1	1	0	0,0%	
139	1	0	1	100,0%	
181	1	0	1	100,0%	
Overall	98	38	60	61,2%	

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	214,189	71	0,000

Test of equality of survival distributions for the different levels of OS.

10. Kaplan-Meier: evento localizzazione del tumore primitivo espresso come cm dal (m.a.e), rispetto a DFS e data inizio nCRT

La popolazione è stata categorizzata in due gruppi in relazione alla localizzazione tumorale: 0= tumore > 6 cm dal mae; 1= tumore ≤ 6 cm dal mae.

Case Processing Summary					
DFSmesi	Total N	N of Events	Censored		Percent
			N	Percent	
2	1	0	1	100,0%	
3	1	1	0	0,0%	
4	2	1	1	50,0%	
8	1	1	0	0,0%	
9	3	2	1	33,3%	
10	3	2	1	33,3%	
11	2	1	1	50,0%	
12	1	1	0	0,0%	
14	2	2	0	0,0%	
15	2	1	1	50,0%	
17	1	0	1	100,0%	
20	2	0	2	100,0%	
22	2	1	1	50,0%	
23	1	1	0	0,0%	
24	1	0	1	100,0%	
25	1	1	0	0,0%	
27	1	1	0	0,0%	
28	1	1	0	0,0%	
29	1	1	0	0,0%	
32	1	0	1	100,0%	
34	1	1	0	0,0%	
36	2	1	1	50,0%	
39	1	1	0	0,0%	
41	1	0	1	100,0%	
48	1	1	0	0,0%	
60	2	2	0	0,0%	
61	1	1	0	0,0%	
63	1	1	0	0,0%	
64	1	1	0	0,0%	
65	2	1	1	50,0%	
71	1	0	1	100,0%	
72	2	1	1	50,0%	
73	1	0	1	100,0%	
76	2	1	1	50,0%	
77	1	1	0	0,0%	
78	2	0	2	100,0%	
79	1	1	0	0,0%	
80	1	1	0	0,0%	
81	1	0	1	100,0%	
82	1	1	0	0,0%	
84	1	1	0	0,0%	
86	2	1	1	50,0%	
88	2	2	0	0,0%	
90	1	0	1	100,0%	
92	1	1	0	0,0%	
93	1	0	1	100,0%	
94	1	1	0	0,0%	
95	2	0	2	100,0%	
97	2	0	2	100,0%	
99	1	1	0	0,0%	
100	4	2	2	50,0%	
103	1	1	0	0,0%	
104	2	1	1	50,0%	
105	2	2	0	0,0%	
106	1	0	1	100,0%	
107	1	1	0	0,0%	
110	1	0	1	100,0%	
111	1	0	1	100,0%	
112	1	0	1	100,0%	
113	1	0	1	100,0%	
114	1	0	1	100,0%	
115	2	2	0	0,0%	
116	1	1	0	0,0%	
117	1	1	0	0,0%	
119	2	2	0	0,0%	
125	1	1	0	0,0%	
128	1	0	1	100,0%	
132	1	1	0	0,0%	
139	1	1	0	0,0%	
181	1	1	0	0,0%	
Overall	97	58	39	40,2%	

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	133,208	69	0,000

Test of equality of survival distributions for the different levels of DFSmesi.

11. Kaplan-Meier: evento risposta al trattamento neoadiuvante (nCRT) rispetto a DFS e data inizio nCRT

La popolazione è stata categorizzata in due gruppi in relazione alla risposta patologica ottenuta: 0= TRG 3-4 BUONA RISPOSTA; 1= TRG 1-2 SCARSA RISPOSTA

Case Processing Summary					
DFSmesi	Total N	N of Events	Censored		
			N	Percent	
2	1	0	1	100,0%	
3	1	0	1	100,0%	
4	2	1	1	50,0%	
8	1	1	0	0,0%	
9	3	2	1	33,3%	
10	3	1	2	66,7%	
11	2	2	0	0,0%	
12	1	0	1	100,0%	
14	2	2	0	0,0%	
15	2	2	0	0,0%	
17	1	1	0	0,0%	
20	1	1	0	0,0%	
22	2	2	0	0,0%	
23	1	0	1	100,0%	
24	1	1	0	0,0%	
25	1	0	1	100,0%	
27	1	0	1	100,0%	
28	1	1	0	0,0%	
29	1	1	0	0,0%	
32	1	1	0	0,0%	
33	1	0	1	100,0%	
34	1	0	1	100,0%	
36	2	0	2	100,0%	
41	1	1	0	0,0%	
48	1	1	0	0,0%	
60	2	0	2	100,0%	
64	1	1	0	0,0%	
65	2	0	2	100,0%	
71	1	0	1	100,0%	
72	2	1	1	50,0%	
73	1	1	0	0,0%	
76	2	0	2	100,0%	
77	1	1	0	0,0%	
78	2	1	1	50,0%	
79	1	1	0	0,0%	
80	1	0	1	100,0%	
81	1	1	0	0,0%	
82	2	2	0	0,0%	
84	1	1	0	0,0%	
86	2	1	1	50,0%	
88	2	0	2	100,0%	
90	1	1	0	0,0%	
92	1	1	0	0,0%	
93	1	1	0	0,0%	
94	1	0	1	100,0%	
95	2	0	2	100,0%	
97	2	2	0	0,0%	
99	1	1	0	0,0%	
100	4	2	2	50,0%	
103	1	1	0	0,0%	
104	2	2	0	0,0%	
105	2	2	0	0,0%	
106	1	0	1	100,0%	
107	1	0	1	100,0%	
110	1	1	0	0,0%	
111	1	1	0	0,0%	
112	1	1	0	0,0%	
113	1	1	0	0,0%	
114	1	0	1	100,0%	
115	2	1	1	50,0%	
116	1	0	1	100,0%	
117	1	0	1	100,0%	
119	2	0	2	100,0%	
125	1	1	0	0,0%	
128	1	1	0	0,0%	
132	1	1	0	0,0%	
139	1	1	0	0,0%	
181	1	1	0	0,0%	
Overall	95	55	40	42,1%	

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	175,865	67	0,000

Test of equality of survival distributions for the different levels of DFSmesi.

12. Kaplan-Meier: evento interessamento margine circonferenziale (CRM) rispetto al DFS e data inizio CRT -
 La popolazione è stata categorizzata in due gruppi: 0= CRM negativo; 1=CRM positivo

Case Processing Summary					
DFSmesi	Total N	N of Events	Censored		
			N	Percent	
2	1	1	0	0,0%	
3	1	1	0	0,0%	
4	2	2	0	0,0%	
8	1	1	0	0,0%	
9	3	3	0	0,0%	
10	3	3	0	0,0%	
11	2	1	1	50,0%	
12	1	1	0	0,0%	
14	2	1	1	50,0%	
15	2	1	1	50,0%	
17	1	1	0	0,0%	
20	2	2	0	0,0%	
22	2	1	1	50,0%	
23	1	1	0	0,0%	
24	1	1	0	0,0%	
25	1	1	0	0,0%	
27	1	1	0	0,0%	
28	1	1	0	0,0%	
29	1	1	0	0,0%	
32	1	1	0	0,0%	
33	1	1	0	0,0%	
34	1	1	0	0,0%	
36	2	2	0	0,0%	
39	1	1	0	0,0%	
41	1	1	0	0,0%	
48	1	1	0	0,0%	
60	2	2	0	0,0%	
61	1	1	0	0,0%	
63	1	0	1	100,0%	
64	1	1	0	0,0%	
65	2	1	1	50,0%	
71	1	1	0	0,0%	
72	2	1	1	50,0%	
73	1	1	0	0,0%	
76	2	2	0	0,0%	
77	1	1	0	0,0%	
78	2	2	0	0,0%	
79	1	1	0	0,0%	
80	1	1	0	0,0%	
81	1	1	0	0,0%	
82	2	1	1	50,0%	
84	1	1	0	0,0%	
86	2	2	0	0,0%	
88	2	2	0	0,0%	
90	1	1	0	0,0%	
92	1	1	0	0,0%	
93	1	1	0	0,0%	
94	1	1	0	0,0%	
95	2	2	0	0,0%	
97	2	2	0	0,0%	
99	1	1	0	0,0%	
100	4	4	0	0,0%	
103	1	1	0	0,0%	
104	2	2	0	0,0%	
105	2	2	0	0,0%	
106	1	1	0	0,0%	
107	1	0	1	100,0%	
110	1	1	0	0,0%	
111	1	1	0	0,0%	
112	1	1	0	0,0%	
113	1	1	0	0,0%	
114	1	1	0	0,0%	
115	2	2	0	0,0%	
116	1	1	0	0,0%	
117	1	1	0	0,0%	
119	2	2	0	0,0%	
125	1	1	0	0,0%	
128	1	1	0	0,0%	
132	1	1	0	0,0%	
139	1	1	0	0,0%	
181	1	1	0	0,0%	
Overall	99	90	9	9,1%	

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	173,673	70	0,000

Test of equality of survival distributions for the different levels of DFSmesi.

13. Kaplan-Meier: evento trattamento chemioterapico adiuvante (Adj) rispetto a DFS e data inizio nCRT
 La popolazione è stata categorizzata in due gruppi: 0=eseguita CT Adj; 1= non eseguita CT Adj

Case Processing Summary					
DFSmesi	Total N	N of Events	Censored		
			N	Percent	
2	1	0	1	100,0%	
3	1	1	0	0,0%	
4	2	1	1	50,0%	
8	1	0	1	100,0%	
9	3	1	2	66,7%	
10	3	2	1	33,3%	
11	2	0	2	100,0%	
12	1	0	1	100,0%	
14	2	0	2	100,0%	
15	2	0	2	100,0%	
17	1	0	1	100,0%	
20	2	0	2	100,0%	
22	2	0	2	100,0%	
23	1	0	1	100,0%	
24	1	0	1	100,0%	
25	1	1	0	0,0%	
27	1	0	1	100,0%	
28	1	0	1	100,0%	
29	1	1	0	0,0%	
32	1	0	1	100,0%	
33	1	0	1	100,0%	
34	1	0	1	100,0%	
36	2	1	1	50,0%	
39	1	0	1	100,0%	
41	1	0	1	100,0%	
48	1	1	0	0,0%	
60	2	0	2	100,0%	
61	1	0	1	100,0%	
63	1	1	0	0,0%	
64	1	0	1	100,0%	
65	2	0	2	100,0%	
71	1	0	1	100,0%	
72	2	1	1	50,0%	
73	1	1	0	0,0%	
76	2	0	2	100,0%	
77	1	0	1	100,0%	
78	2	1	1	50,0%	
79	1	0	1	100,0%	
80	1	0	1	100,0%	
81	1	0	1	100,0%	
82	2	1	1	50,0%	
84	1	0	1	100,0%	
86	2	0	2	100,0%	
88	2	1	1	50,0%	
90	1	0	1	100,0%	
92	1	0	1	100,0%	
93	1	1	0	0,0%	
94	1	1	0	0,0%	
95	2	0	2	100,0%	
97	2	1	1	50,0%	
99	1	0	1	100,0%	
100	4	1	3	75,0%	
103	1	0	1	100,0%	
104	2	0	2	100,0%	
105	2	0	2	100,0%	
106	1	0	1	100,0%	
107	1	0	1	100,0%	
110	1	0	1	100,0%	
111	1	0	1	100,0%	
112	1	0	1	100,0%	
113	1	0	1	100,0%	
114	1	0	1	100,0%	
115	2	1	1	50,0%	
116	1	0	1	100,0%	
117	1	0	1	100,0%	
119	2	0	2	100,0%	
125	1	0	1	100,0%	
128	1	0	1	100,0%	
132	1	0	1	100,0%	
139	1	0	1	100,0%	
181	1	1	0	0,0%	
Overall	99	21	78	78,8%	

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log_Rank (Mantel-Cox)	184,626	70	0,000

Test of equality of survival distributions for the different levels of DFSmesi.

14. Kaplan-Meier: evento CT neo-adiuvante contenente o meno oxaliplatino rispetto a DFS e data inizio nCRT
 La popolazione è stata categorizzata in due gruppi: 0=CT senza oxa; 1=CT contenente oxa

Case Processing Summary					
DFSmesi	Total N	N of Events	Censored		
			N	Percent	
2	1	1	0	0,0%	
3	1	0	1	100,0%	
4	2	1	1	50,0%	
8	1	1	0	0,0%	
9	3	2	1	33,3%	
10	3	1	2	66,7%	
11	2	1	1	50,0%	
12	1	0	1	100,0%	
14	2	2	0	0,0%	
15	2	0	2	100,0%	
17	1	0	1	100,0%	
20	2	1	1	50,0%	
22	2	1	1	50,0%	
23	1	1	0	0,0%	
24	1	0	1	100,0%	
25	1	0	1	100,0%	
27	1	0	1	100,0%	
28	1	0	1	100,0%	
29	1	0	1	100,0%	
32	1	0	1	100,0%	
33	1	1	0	0,0%	
34	1	0	1	100,0%	
36	2	1	1	50,0%	
39	1	0	1	100,0%	
41	1	0	1	100,0%	
48	1	1	0	0,0%	
60	2	0	2	100,0%	
61	1	1	0	0,0%	
63	1	1	0	0,0%	
64	1	1	0	0,0%	
65	2	0	2	100,0%	
71	1	0	1	100,0%	
72	2	0	2	100,0%	
73	1	0	1	100,0%	
76	2	0	2	100,0%	
77	1	1	0	0,0%	
78	2	1	1	50,0%	
79	1	1	0	0,0%	
80	1	0	1	100,0%	
81	1	1	0	0,0%	
82	2	2	0	0,0%	
84	1	1	0	0,0%	
86	2	2	0	0,0%	
88	2	1	1	50,0%	
90	1	1	0	0,0%	
92	1	1	0	0,0%	
93	1	1	0	0,0%	
94	1	0	1	100,0%	
95	2	0	2	100,0%	
97	2	2	0	0,0%	
99	1	0	1	100,0%	
100	4	3	1	25,0%	
103	1	1	0	0,0%	
104	2	1	1	50,0%	
105	2	1	1	50,0%	
106	1	0	1	100,0%	
107	1	1	0	0,0%	
110	1	0	1	100,0%	
111	1	0	1	100,0%	
112	1	0	1	100,0%	
113	1	1	0	0,0%	
114	1	0	1	100,0%	
115	2	1	1	50,0%	
116	1	0	1	100,0%	
117	1	0	1	100,0%	
119	2	1	1	50,0%	
125	1	0	1	100,0%	
128	1	0	1	100,0%	
132	1	0	1	100,0%	
139	1	1	0	0,0%	
181	1	1	0	0,0%	
Overall	99	45	54	54,5%	

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	207,041	70	0,000

Test of equality of survival distributions for the different levels of DFSmesi.

15. Kaplan-Meier: evento estensione del tumore alla diagnosi (cT) rispetto a DFS e data inizio nCRT

La popolazione è stata categorizzata in due gruppi: 0= cT2-3; 1= cT4

Case Processing Summary					
DFSmesi	Total N	N of Events	Censored		
			N	Percent	
2	1	1	0	0	0,0%
3	1	0	1	100,0%	
4	2	2	0	0,0%	
8	1	0	1	100,0%	
9	3	3	0	0,0%	
10	3	1	2	66,7%	
11	2	2	0	0,0%	
12	1	1	0	0,0%	
14	2	2	0	0,0%	
15	2	2	0	0,0%	
17	1	1	0	0,0%	
20	2	1	1	50,0%	
22	2	1	1	50,0%	
23	1	1	0	0,0%	
24	1	0	1	100,0%	
25	1	1	0	0,0%	
27	1	1	0	0,0%	
28	1	1	0	0,0%	
29	1	1	0	0,0%	
32	1	1	0	0,0%	
33	1	1	0	0,0%	
34	1	1	0	0,0%	
36	2	2	0	0,0%	
39	1	1	0	0,0%	
41	1	1	0	0,0%	
48	1	1	0	0,0%	
60	2	2	0	0,0%	
61	1	1	0	0,0%	
63	1	1	0	0,0%	
64	1	0	1	100,0%	
65	2	2	0	0,0%	
71	1	1	0	0,0%	
72	2	1	1	50,0%	
73	1	0	1	100,0%	
76	2	1	1	50,0%	
77	1	1	0	0,0%	
78	2	2	0	0,0%	
79	1	1	0	0,0%	
80	1	1	0	0,0%	
81	1	1	0	0,0%	
82	2	1	1	50,0%	
84	1	1	0	0,0%	
86	2	1	1	50,0%	
88	2	2	0	0,0%	
90	1	1	0	0,0%	
92	1	1	0	0,0%	
93	1	1	0	0,0%	
94	1	1	0	0,0%	
95	2	2	0	0,0%	
97	2	2	0	0,0%	
99	1	1	0	0,0%	
100	4	4	0	0,0%	
103	1	1	0	0,0%	
104	2	2	0	0,0%	
105	2	1	1	50,0%	
106	1	1	0	0,0%	
107	1	0	1	100,0%	
110	1	1	0	0,0%	
111	1	0	1	100,0%	
112	1	1	0	0,0%	
113	1	1	0	0,0%	
114	1	1	0	0,0%	
115	2	2	0	0,0%	
116	1	1	0	0,0%	
117	1	1	0	0,0%	
119	2	2	0	0,0%	
125	1	1	0	0,0%	
128	1	1	0	0,0%	
132	1	1	0	0,0%	
139	1	1	0	0,0%	
181	1	1	0	0,0%	
Overall	99		83	16	16,2%

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log_Rank (Mantel-Cox)	166,602	70	0,000

Test of equality of survival distributions for the different levels of DFSmesi.

16. Kaplan-Meier: evento risposta patologica completa pCR rispetto a DFS e data inizio nCRT
 La popolazione è stata categorizzata in due gruppi: 0= presente pCR; 1= assente pCR

Case Processing Summary					
DFSmesi	Total N	N of Events	Censored		
			N	Percent	
2	1	0	1	100,0%	
3	1	1	0	0,0%	
4	2	2	0	0,0%	
8	1	1	0	0,0%	
9	3	3	0	0,0%	
10	3	2	1	33,3%	
11	2	2	0	0,0%	
12	1	0	1	100,0%	
14	2	2	0	0,0%	
15	2	2	0	0,0%	
17	1	1	0	0,0%	
20	2	2	0	0,0%	
22	2	2	0	0,0%	
23	1	0	1	100,0%	
24	1	1	0	0,0%	
25	1	1	0	0,0%	
27	1	1	0	0,0%	
28	1	1	0	0,0%	
29	1	1	0	0,0%	
32	1	1	0	0,0%	
33	1	1	0	0,0%	
34	1	1	0	0,0%	
36	2	1	1	50,0%	
39	1	1	0	0,0%	
41	1	1	0	0,0%	
48	1	1	0	0,0%	
60	2	2	0	0,0%	
61	1	1	0	0,0%	
63	1	1	0	0,0%	
64	1	1	0	0,0%	
65	2	2	0	0,0%	
71	1	1	0	0,0%	
72	2	2	0	0,0%	
73	1	1	0	0,0%	
76	2	1	1	50,0%	
77	1	1	0	0,0%	
78	2	2	0	0,0%	
79	1	1	0	0,0%	
80	1	0	1	100,0%	
81	1	1	0	0,0%	
82	2	2	0	0,0%	
84	1	1	0	0,0%	
86	2	2	0	0,0%	
88	2	1	1	50,0%	
90	1	1	0	0,0%	
92	1	1	0	0,0%	
93	1	1	0	0,0%	
94	1	0	1	100,0%	
95	2	1	1	50,0%	
97	2	2	0	0,0%	
99	1	1	0	0,0%	
100	4	3	1	25,0%	
103	1	1	0	0,0%	
104	2	2	0	0,0%	
105	2	2	0	0,0%	
106	1	0	1	100,0%	
107	1	1	0	0,0%	
110	1	1	0	0,0%	
111	1	1	0	0,0%	
112	1	1	0	0,0%	
113	1	1	0	0,0%	
114	1	1	0	0,0%	
115	2	2	0	0,0%	
116	1	0	1	100,0%	
117	1	0	1	100,0%	
119	2	2	0	0,0%	
125	1	1	0	0,0%	
128	1	1	0	0,0%	
132	1	1	0	0,0%	
139	1	1	0	0,0%	
181	1	1	0	0,0%	
Overall	99	85	14	14,1%	

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	151,718	70	0,000

Test of equality of survival distributions for the different levels of DFSmesi.

17. Kaplan-Meier: evento coinvolgimento patologico linfonodale (pN)rispetto a DFS e data inizio nCRT
 La popolazione è stata categorizzata in due gruppi: 0= pN negativo; 1= pN positivo

Case Processing Summary					
DFSmesi	Total N	N of Events	Censored		
			N	Percent	
2	1	1	0	0,0%	
3	1	0	1	100,0%	
4	2	2	0	0,0%	
8	1	0	1	100,0%	
9	3	1	2	66,7%	
10	3	3	0	0,0%	
11	2	1	1	50,0%	
12	1	1	0	0,0%	
14	2	2	0	0,0%	
15	2	1	1	50,0%	
17	1	1	0	0,0%	
20	2	1	1	50,0%	
22	2	1	1	50,0%	
23	1	1	0	0,0%	
24	1	1	0	0,0%	
25	1	0	1	100,0%	
27	1	0	1	100,0%	
28	1	1	0	0,0%	
29	1	1	0	0,0%	
32	1	0	1	100,0%	
33	1	1	0	0,0%	
34	1	1	0	0,0%	
36	2	2	0	0,0%	
39	1	0	1	100,0%	
41	1	1	0	0,0%	
48	1	1	0	0,0%	
60	2	0	2	100,0%	
61	1	1	0	0,0%	
63	1	1	0	0,0%	
64	1	0	1	100,0%	
65	2	2	0	0,0%	
71	1	1	0	0,0%	
72	2	2	0	0,0%	
73	1	0	1	100,0%	
76	2	2	0	0,0%	
77	1	1	0	0,0%	
78	2	2	0	0,0%	
79	1	1	0	0,0%	
80	1	1	0	0,0%	
81	1	1	0	0,0%	
82	2	0	2	100,0%	
84	1	0	1	100,0%	
86	2	1	1	50,0%	
88	2	2	0	0,0%	
90	1	0	1	100,0%	
92	1	1	0	0,0%	
93	1	0	1	100,0%	
94	1	1	0	0,0%	
95	2	2	0	0,0%	
97	2	1	1	50,0%	
99	1	1	0	0,0%	
100	4	3	1	25,0%	
103	1	1	0	0,0%	
104	2	1	1	50,0%	
105	2	2	0	0,0%	
106	1	1	0	0,0%	
107	1	1	0	0,0%	
110	1	1	0	0,0%	
111	1	1	0	0,0%	
112	1	1	0	0,0%	
113	1	1	0	0,0%	
114	1	1	0	0,0%	
115	2	1	1	50,0%	
116	1	1	0	0,0%	
117	1	1	0	0,0%	
119	2	2	0	0,0%	
125	1	1	0	0,0%	
128	1	1	0	0,0%	
132	1	1	0	0,0%	
139	1	1	0	0,0%	
181	1	1	0	0,0%	
Overall	99	73	26	26,3%	

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	145,006	70	0,000

Test of equality of survival distributions for the different levels of DFSmesi.

18. Kaplan-Meier: evento coinvolgimento clinico iniziale linfonodale (cTanyN) rispetto a DFS e data inizio nCRT

La popolazione è stata categorizzata in due gruppi: 0= cTanyN0; 1= cTanyN+

Case Processing Summary					
DFSmesi	Total N	N of Events	Censored		
			N	Percent	
2	1	1	0	0,0%	
3	1	0	1	100,0%	
4	2	1	1	50,0%	
8	1	0	1	100,0%	
9	3	1	2	66,7%	
10	3	0	3	100,0%	
11	2	1	1	50,0%	
12	1	1	0	0,0%	
14	2	1	1	50,0%	
15	2	1	1	50,0%	
17	1	0	1	100,0%	
20	2	1	1	50,0%	
22	2	0	2	100,0%	
23	1	1	0	0,0%	
24	1	0	1	100,0%	
25	1	1	0	0,0%	
27	1	1	0	0,0%	
28	1	0	1	100,0%	
29	1	1	0	0,0%	
32	1	0	1	100,0%	
33	1	1	0	0,0%	
34	1	1	0	0,0%	
36	2	1	1	50,0%	
39	1	1	0	0,0%	
41	1	1	0	0,0%	
48	1	0	1	100,0%	
60	2	0	2	100,0%	
61	1	0	1	100,0%	
63	1	0	1	100,0%	
64	1	0	1	100,0%	
65	2	0	2	100,0%	
71	1	1	0	0,0%	
72	2	0	2	100,0%	
73	1	0	1	100,0%	
76	2	0	2	100,0%	
77	1	1	0	0,0%	
78	2	1	1	50,0%	
79	1	0	1	100,0%	
80	1	1	0	0,0%	
81	1	1	0	0,0%	
82	2	0	2	100,0%	
84	1	0	1	100,0%	
86	2	1	1	50,0%	
88	2	1	1	50,0%	
90	1	0	1	100,0%	
92	1	0	1	100,0%	
93	1	1	0	0,0%	
94	1	1	0	0,0%	
95	2	1	1	50,0%	
97	2	1	1	50,0%	
99	1	1	0	0,0%	
100	4	2	2	50,0%	
103	1	0	1	100,0%	
104	2	1	1	50,0%	
105	2	1	1	50,0%	
106	1	0	1	100,0%	
107	1	0	1	100,0%	
110	1	0	1	100,0%	
111	1	0	1	100,0%	
112	1	0	1	100,0%	
113	1	1	0	0,0%	
114	1	1	0	0,0%	
115	2	1	1	50,0%	
116	1	1	0	0,0%	
117	1	0	1	100,0%	
119	2	0	2	100,0%	
125	1	1	0	0,0%	
128	1	0	1	100,0%	
132	1	1	0	0,0%	
139	1	0	1	100,0%	
181	1	0	1	100,0%	
Overall	99	39	60	60,6%	

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	218,895	70	0,000

Test of equality of survival distributions for the different levels of DFSmesi.