

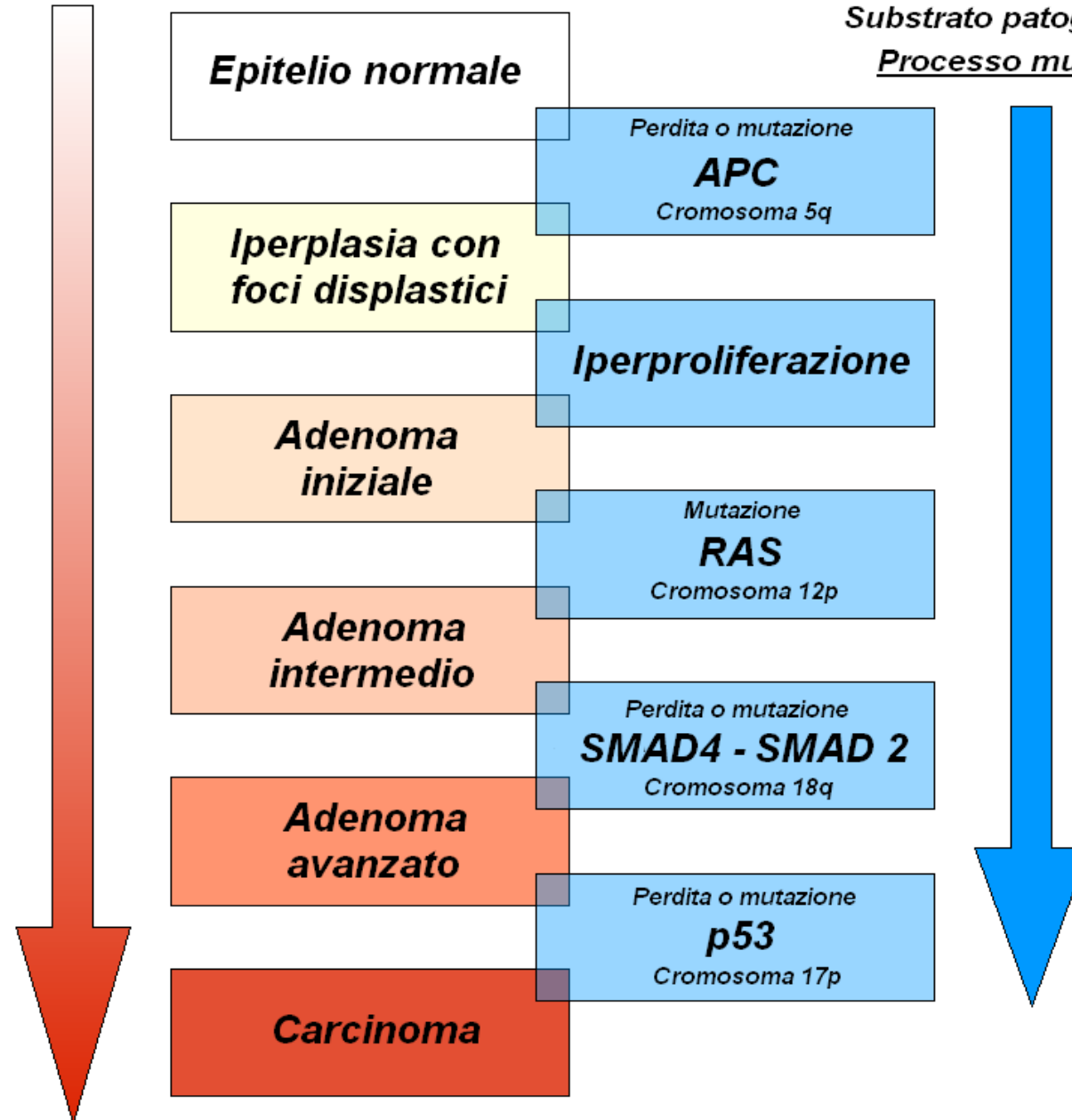
Dati epidemiologici

- Il tumore coloretta è al terzo posto per incidenza e causa di morte per tumore dopo il tumore alla prostata e al polmone negli uomini e dopo tumore alla mammella e al polmone nelle donne.
- Almeno il 50% della popolazione occidentale, a partire dall'età di 70 anni, sviluppa un adenoma che nel 10% dei casi va incontro a trasformazione tumorale.

TUMOR PROGRESSION

*Evoluzione
anatomo-patologica*

*Substrato patogenetico
Processo multistep*



Il carcinoma del colon retto è caratterizzato da alterazioni molecolari a carico di numerosi oncogeni e geni oncosoppressori che cooperano nel determinare la trasformazione neoplastica.

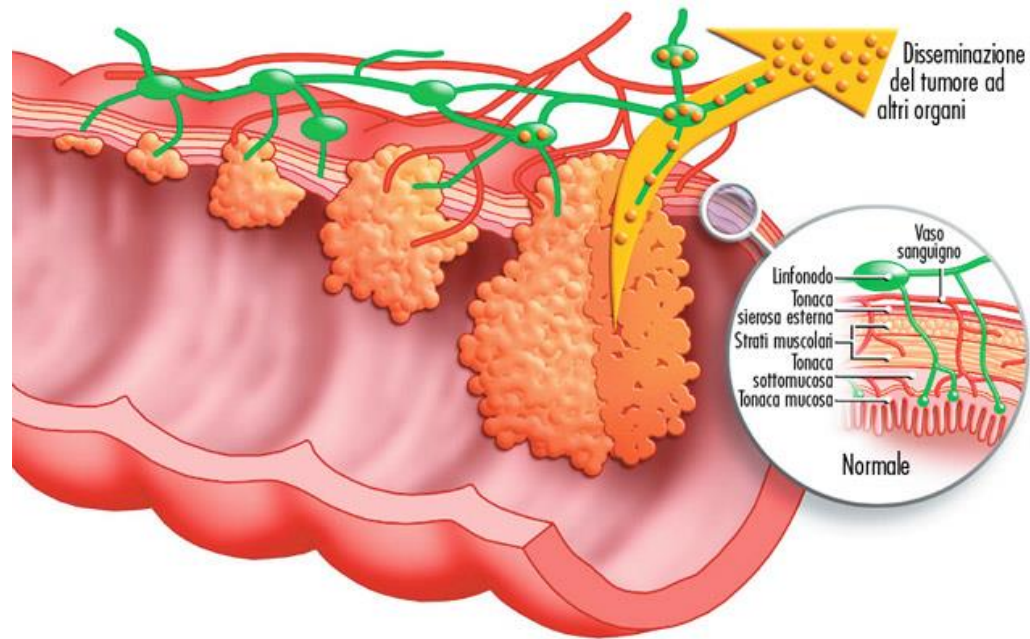
Circa l'90% dei casi di CRC sono di tipo sporadico.

Il rimanente 10% è considerato di tipo familiare o legato a sindromi genetiche:

- **poliposi adenomatosa familiare (FAP)**, associata a mutazioni del gene *APC* (*adenomatous polyposis coli*)
- **carcinoma del colon-retto ereditario non-poliposico**, caratterizzato da mutazioni germinali dei geni *mismatch repair* (*MMR*), soprattutto *hMSH2*, *hMSH6*, *hMLH1* e *hPMS2*.

Principali vie di progressione del tumore del colon

| | Prevalenza | Eventi |
|---|------------|--|
| Instabilità cromosomica (CIN) | 80-85% | CRC caratterizzati da aneuploidia, inattivazione di APC/ β catenina, accumulo mutazioni in oncogeni (p.es. RAS) e geni oncosoppressori (p.es. p53), «perdite» e «guadagni» allelici. |
| Instabilità dei microsatelliti (MSI) | 15-20% | CRC caratterizzati da mutazioni o epimutazioni in geni del sistema di riparazione degli accoppiamenti errati (MMR), con conseguenti inserzioni e/o delezioni nei microsatelliti) |
| Metilazione isole CpG (CIMP) (Metilazione aberrante del DNA) | ~ 20% | CRC caratterizzati da ipermetilazione di isole CpG in multipli promotori (spesso sono associate mutazioni in BRAF) |



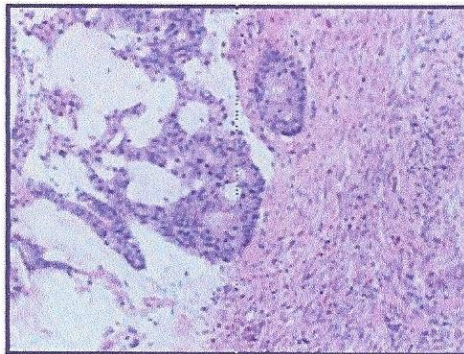
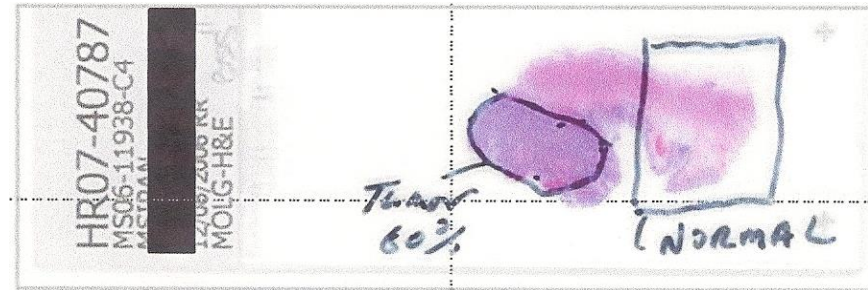
Stadiazione del tumore del colon-retto

Dopo avere confermato la diagnosi di **carcinoma** del colon-retto, va eseguita una **stadiazione** della malattia, cioè ne vanno stabilite l'estensione locale e l'eventuale diffusione a distanza.

Sulla base della stadiazione, s'impone il trattamento.

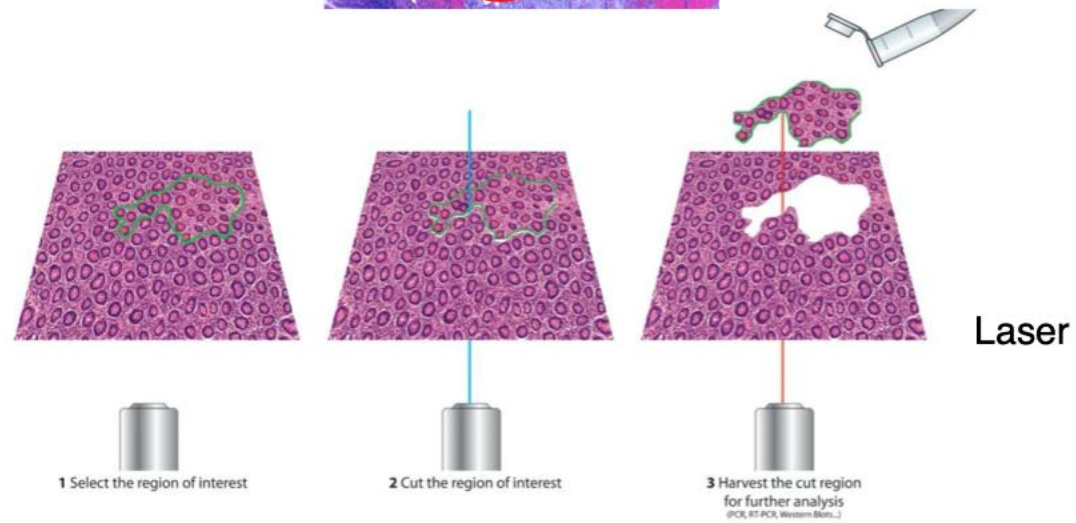
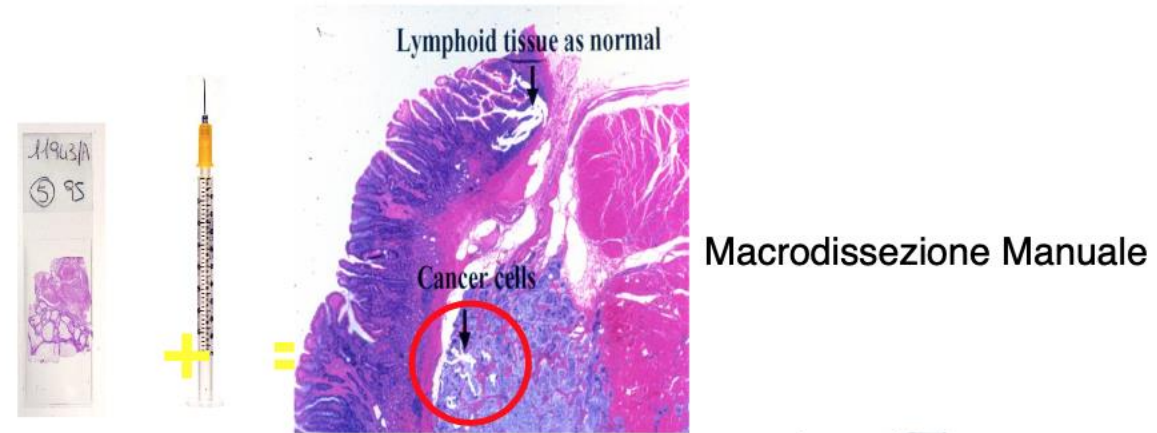
Caratterizzazione Adenocarcinoma colon

Analisi molecolare EGFr



- Selezionare il blocchetto con tessuto neoplastico
- Campioni con almeno il 70-80% di tumore infiltrante

ARRICCHIMENTO TISSUTALE



TECNICHE DI ANALISI MUTAZIONALE

Tecniche di screening:
Rilevazione di tutte le mutazioni presenti

Tecniche a bersaglio molecolare:
Rilevazione di mutazioni specifiche

| | Metodo | Sensibilità (% di DNA mutato) |
|---------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Tecniche di screening | Sequenziamento diretto (Sanger) | 10-20% |
| | Pirosequenziamento | 5-10% |
| | High resolution melting analysis | 5% |
| Tecniche a bersaglio molecolare | ARMS Real-Time PCR | 1-5% |
| | Strip hybridization | 1% |
| | PNA/LNA Clamp | 0.1%-1% |
| | ME PCR/Sequencing | 0.1%-1% |
| | Digital PCR | 0.1% |

* Le differenze in sensibilità non danno risultati diversi quando il tessuto è ben selezionato

Principali vie di progressione del tumore del colon

| | Prevalenza | Eventi |
|---|------------|--|
| Instabilità cromosomica (CIN) | 80-85% | CRC caratterizzati da aneuploidia, inattivazione di APC/ β catenina, accumulo mutazioni in oncogeni (p.es. RAS) e geni oncosoppressori (p.es. p53), «perdite» e «guadagni» allelici. |
| Instabilità dei microsatelliti (MSI) | 15-20% | CRC caratterizzati da mutazioni o epimutazioni in geni del sistema di riparazione degli accoppiamenti errati (MMR), con conseguenti inserzioni e/o delezioni nei microsatelliti) |
| Metilazione isole CpG (CIMP) (Metilazione aberrante del DNA) | ~ 20% | CRC caratterizzati da ipermetilazione di isole CpG in multipli promotori (spesso sono associate mutazioni in BRAF) |

2) L'instabilità cromosomica (CIN)

La maggioranza dei CRC sporadici mostra un certo grado di CIN che è associata ad anomalie cromosomiche, come delezioni ed inserzioni, con attivazione di proto-oncogeni ed inattivazione di geni tumor-suppressor, così come aneuploidia o poliploidia cromosomica.

Numerosi geni coinvolti nella carcinogenesi intestinale subiscono alterazioni genetiche dovute alla CIN, come EGFR APC, TP53, KRAS, BRAF, PTEN, SRC, TGF- β , SMAD 2 e 4.

L'instabilità cromosomica (CIN) è alla base del modello di progressione del tumore coloretale proposto da Vogelstein et al. nel 1988:

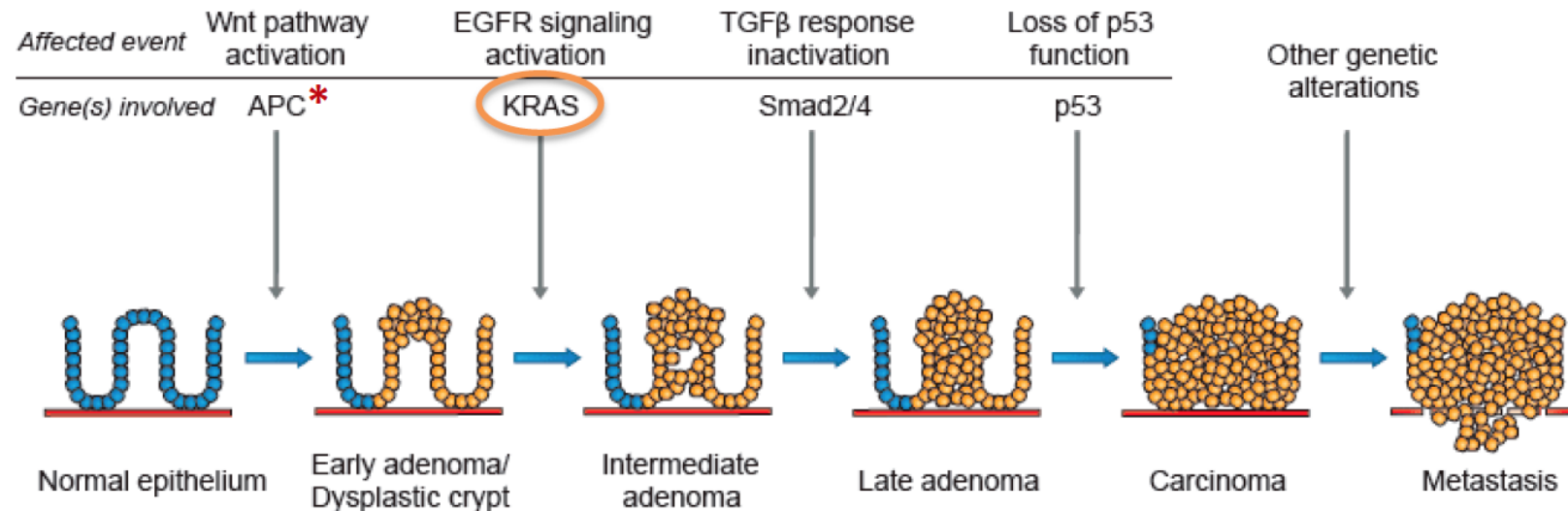


Figura da Davies et al, Nature Review Cancer 2005; 5:199-209, modificata

* mutazioni nel gene APC, coinvolto nel pathway proliferativo di WNT, caratterizzano la Poliposi Adenomatosa Familiare (FAP). In un sottotipo di FAP la mutazione è nel gene MUTYH, una glicosilasi coinvolta nel sistema di riparazione per escissione delle basi, BER).

EGFR

- EGFR risulta iperespresso nel 80-85% dei casi di carcinoma colon-retto
- L'iperpressione di EGFR è correlata all'amplificazione ed alla mutazione del gene

La **prognosi** dei pazienti con tumore del colon è migliorata notevolmente durante gli ultimi anni, grazie a nuove alternative terapeutiche.

In particolare, **durante la fase metastatica** della malattia, oltre ai chemioterapici tradizionali sono utilizzabili altri farmaci a bersaglio molecolare, come, ad esempio, i farmaci anti-angiogenici e anticorpi in grado di inibire EGFR.

I farmaci a bersaglio molecolare attualmente impiegati nella terapia del tumore del colon-retto appartengono alla categoria degli anticorpi monoclonali

Gli anticorpi monoclonali rivolti contro il fattore di crescita epidermico (anti-EGFR): sono in grado di agire in modo mirato sui meccanismi che regolano la crescita del tumore.

Vengono utilizzati generalmente in associazione alla chemioterapia tradizionale nei pazienti con malattia metastatica.

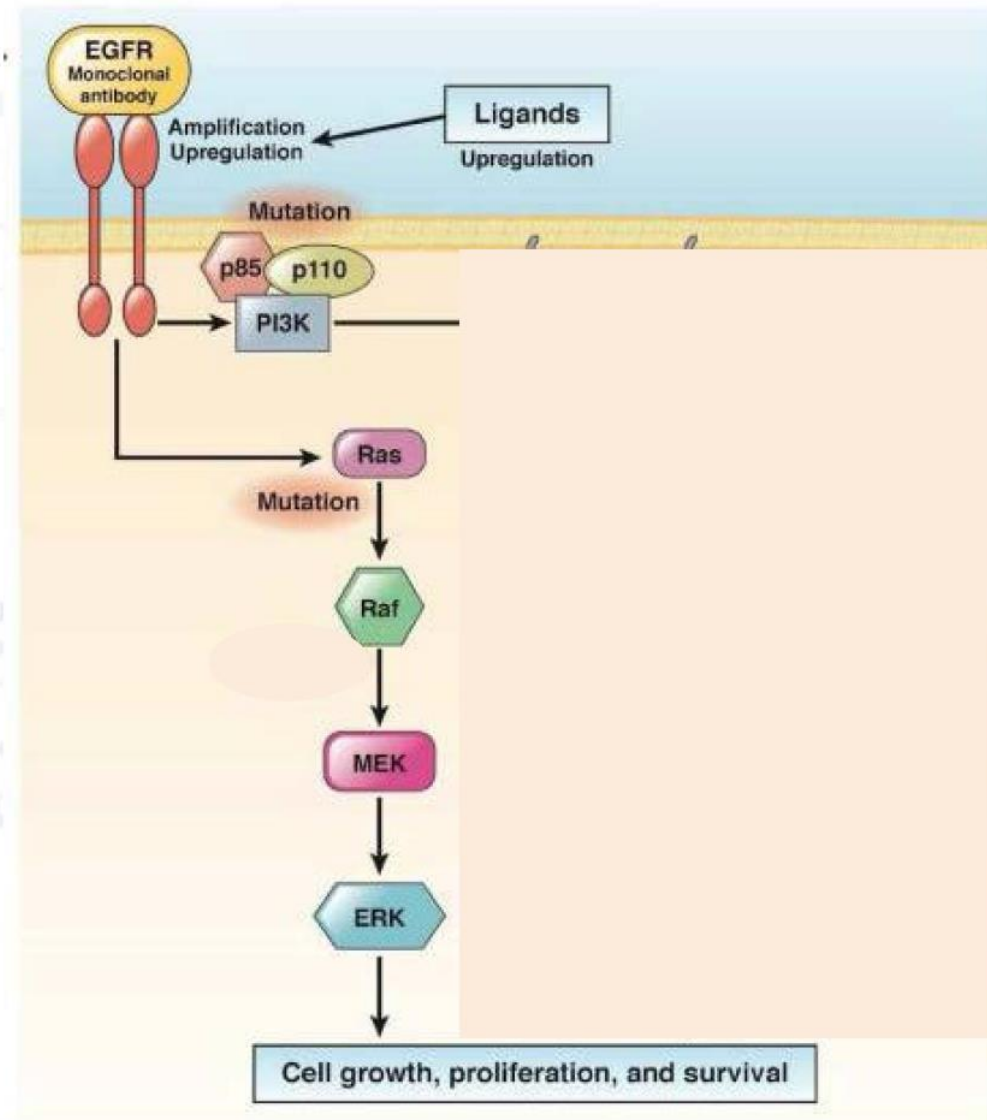
Cetuximab e panitumumab sono fra i prodotti di questo tipo più impiegati nella cura del tumore del colon-retto.

GENI KRAS e NRAS.

Mutazioni del gene RAS

Il gene RAS codifica per una famiglia di proteine attivate dal recettore attivato EGFR e coinvolte nella trasmissione di segnali proliferativi.

Mutazioni di RAS sono presenti in circa il 50% dei tumori del colon metastatici e determinano un'attivazione costante della via di proliferazione cellulare, indipendentemente dalla stimolazione di EGFR.

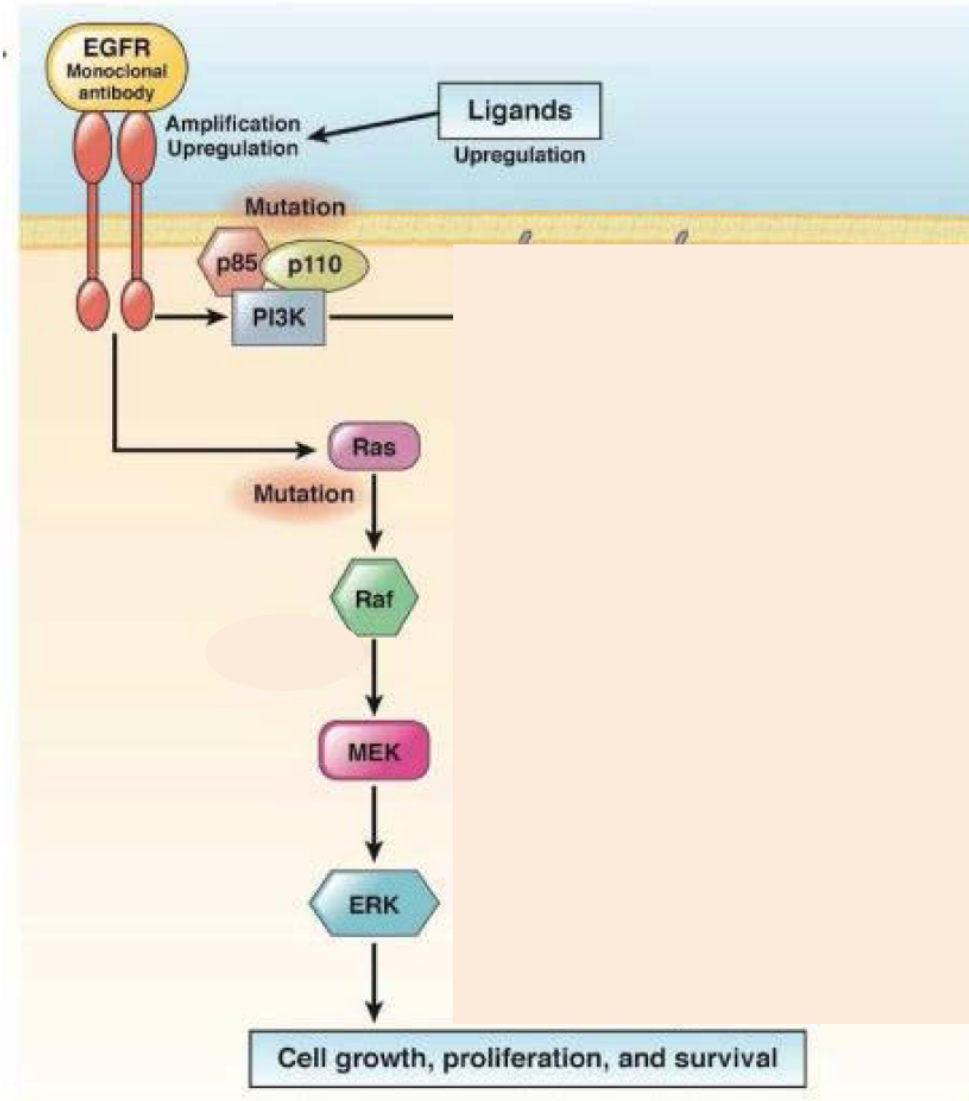


Da Carethers and Jung (2015) Gastroenterology, 149:1177-90, modificata.

Attualmente sono disponibili anticorpi monoclonali anti-EGFR, che bloccano l'attivazione di EGFR e di conseguenza la trasduzione del segnale a valle.

In presenza delle mutazioni del gene RAS, i farmaci anti-EGFR sono inattivi.

54,0 x 190,5 mm



Da Carethers and Jung (2015) *Gastroenterology*, 149:1177-90, modificata.

GENI KRAS e NRAS.

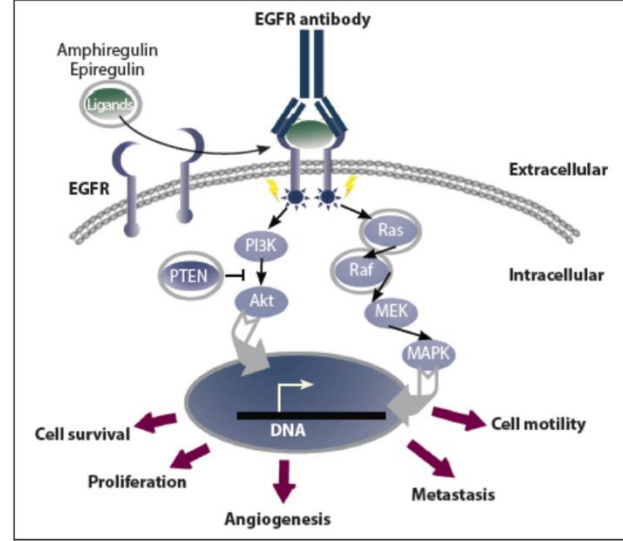
Le proteine RAS giocano un ruolo importante nei processi di crescita e moltiplicazione cellulare. Infatti, essi agiscono come "interruttori" che servono ad "accendere" la moltiplicazione cellulare, a seguito della interazione fra EGF, un fattore di crescita cellulare, e il suo recettore EGFR.

Nelle cellule normali e in quelle del tumore del colon-retto metastatico senza mutazioni dei geni RAS, tali interruttori si accendono e poi si spengono immediatamente, in un'alternanza che attiva o disattiva la replicazione cellulare.

Se invece il gene RAS è mutato, anche la proteina da esso prodotta sarà diversa e si comporterà come un interruttore che resta perennemente "acceso", indipendentemente dagli stimoli che il fattore di crescita EGF determina legandosi al recettore EGFR.

Attivazione EGFR

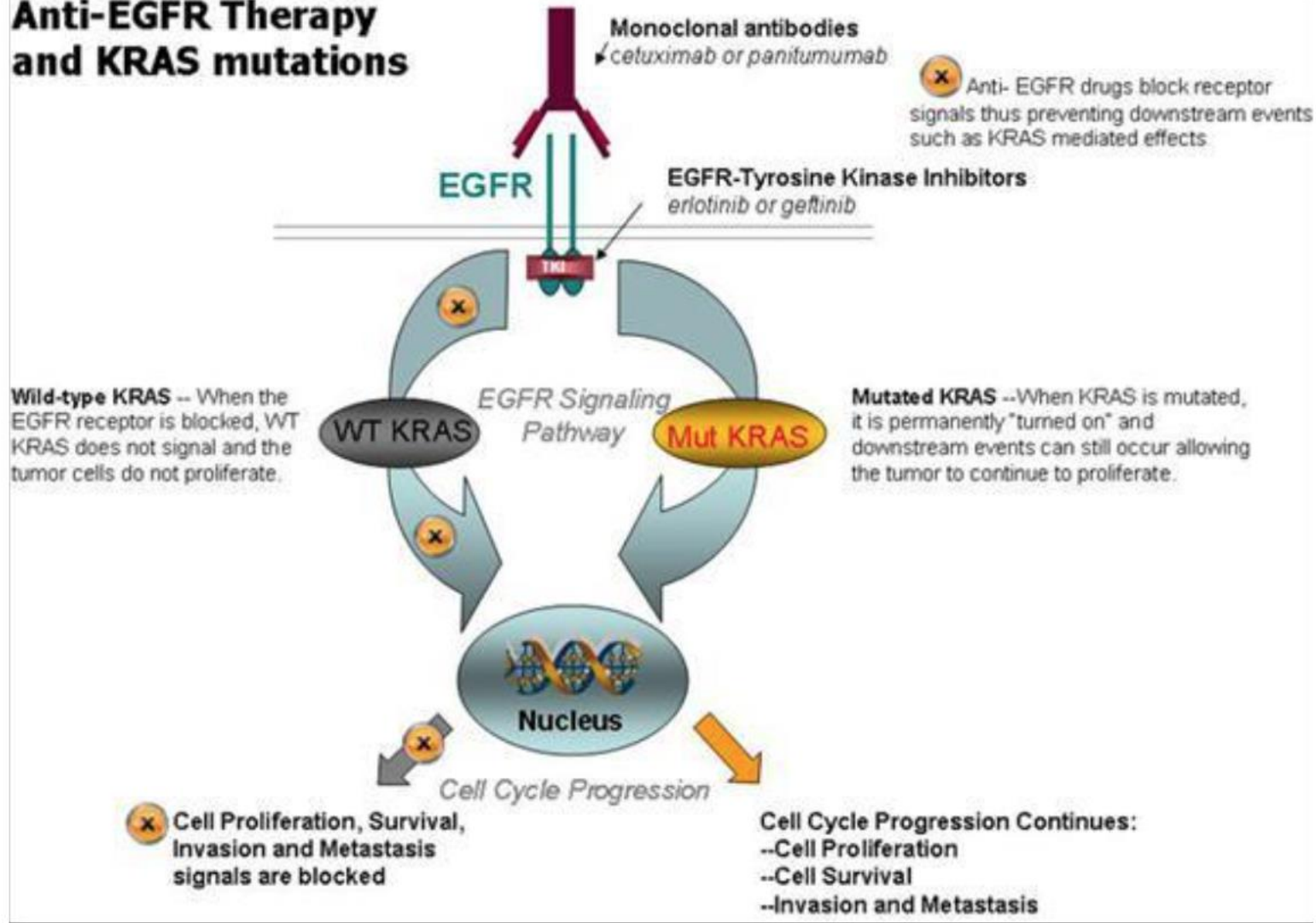
- stimolazione proliferazione cellulare (attivazione via RAS)
- inibizione dell'apoptosi (attivazione PI3K)

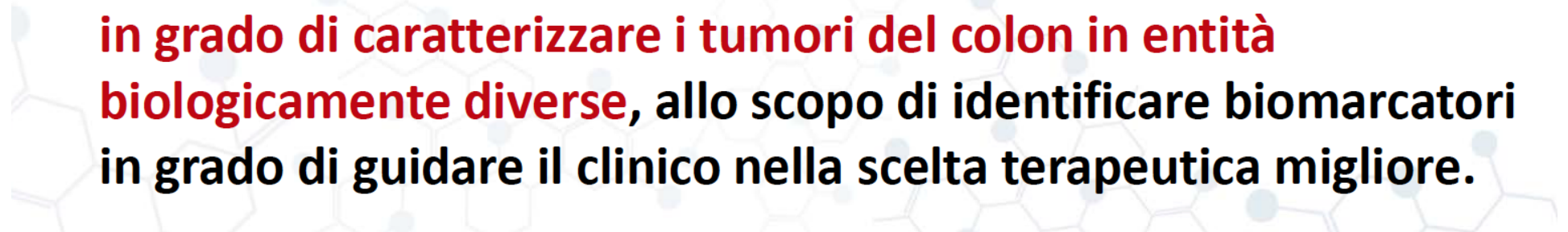


Nel paziente con **tumore del colon-retto metastatico**, al momento di intraprendere un trattamento, deve essere effettuata la valutazione dello stato mutazionale di KRAS ed NRAS.

La presenza di mutazioni somatiche nei geni KRAS ed NRAS è infatti un meccanismo di resistenza agli anticorpi monoclonali anti-EGFR e, pertanto, l'analisi mutazionale è indispensabile per una corretta programmazione terapeutica.

Anti-EGFR Therapy and KRAS mutations

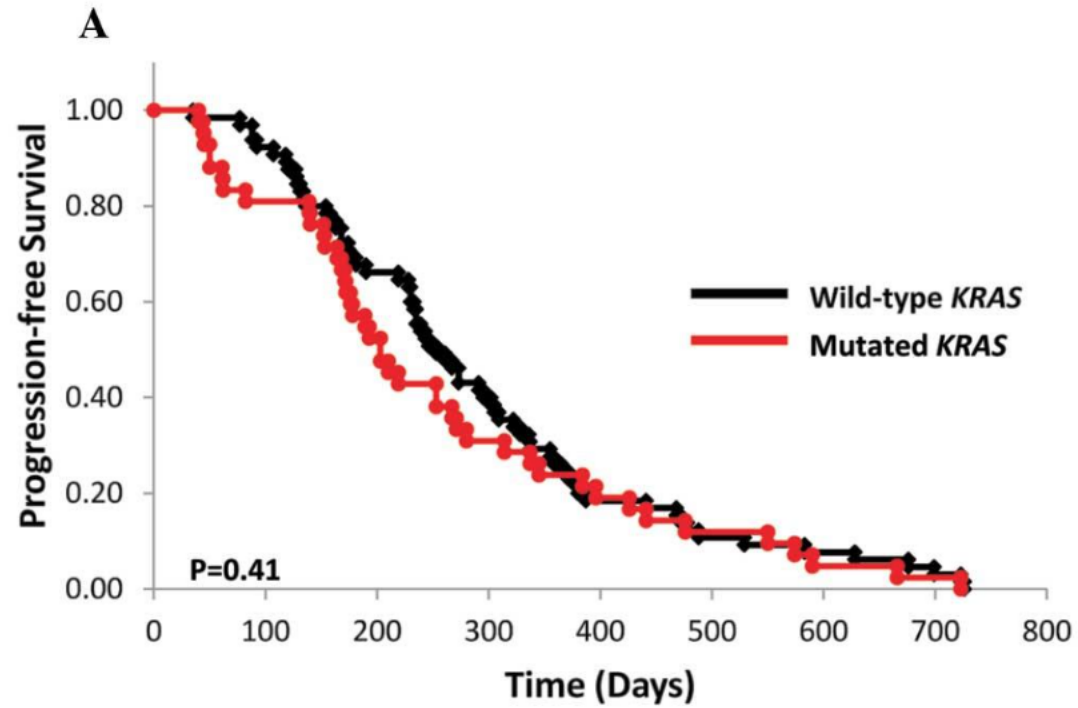




Risulta chiara l'importanza di strumenti di indagine molecolare in grado di caratterizzare i tumori del colon in entità biologicamente diverse, allo scopo di identificare biomarcatori in grado di guidare il clinico nella scelta terapeutica migliore.

Biomarcatori

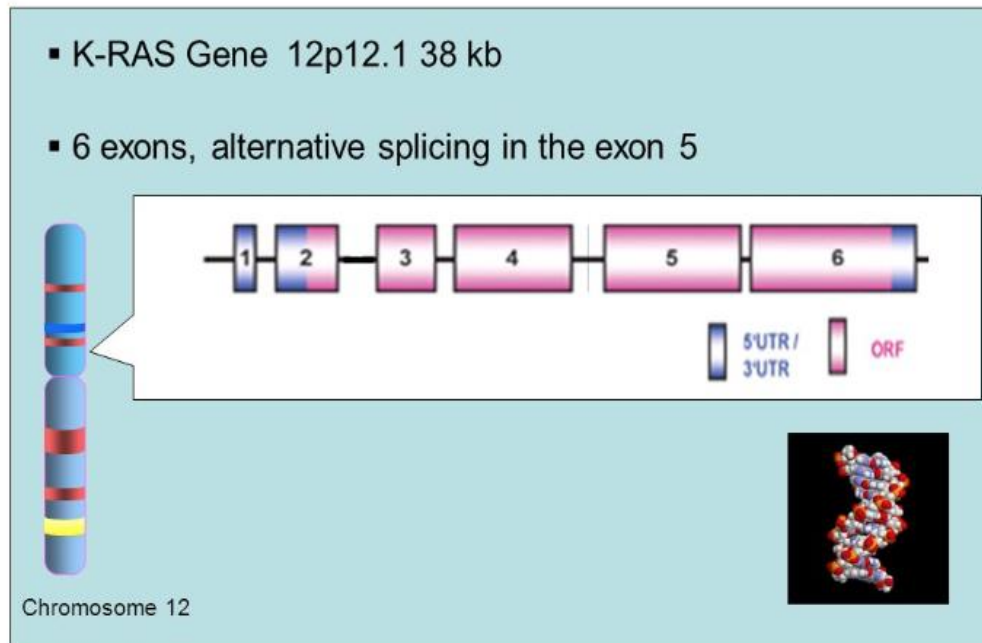
RAS è un biomarcatore predittivo di Risposta alla terapia anti EGFR



MUTAZIONI KRAS

- Mutazioni puntiformi missenso che portano alla sostituzione di un AA
- Presenti nel 35-45% dei carcinomi
- Le più frequenti nel codone 12 (esone 2: G12D, G12V)
- Esistono anche nei codoni 59, 61(esone 3), 117 e 146 (esone 4)

GENE K-RAS



L'analisi mutazionale di KRAS ed NRAS può essere condotta con diverse metodiche e deve riguardare almeno i codoni 12, 13, 59, 61, 117 e 146 di entrambi i geni.

L'esecuzione dei test di biologia molecolare

In considerazione dell'alta concordanza fra le mutazioni riscontrate nei tumori primitivi e nelle corrispondenti metastasi epatiche, la determinazione dello stato mutazionale di RAS può essere effettuata indifferentemente su tessuto tumorale primitivo o metastatico.

Un tasso di discordanza del 25% circa è stato invece descritto tra tumore primitivo e metastasi linfonodali e polmonari

Alcuni studi hanno evidenziato la possibilità di eseguire il **test RAS su DNA tumorale circolante** isolato da sangue periferico ed un kit dedicato è stato recentemente approvato per l'utilizzo clinico avendo ricevuto la certificazione CE-IVD.

L'analisi del DNA tumorale circolante è pertanto consigliata in casi particolari in cui non sia disponibile tessuto adeguato per il test molecolare e dovrà essere comunque condotta con metodiche approvate per l'impiego clinico ed in laboratori di riferimento.

Principali vie di progressione del tumore del colon

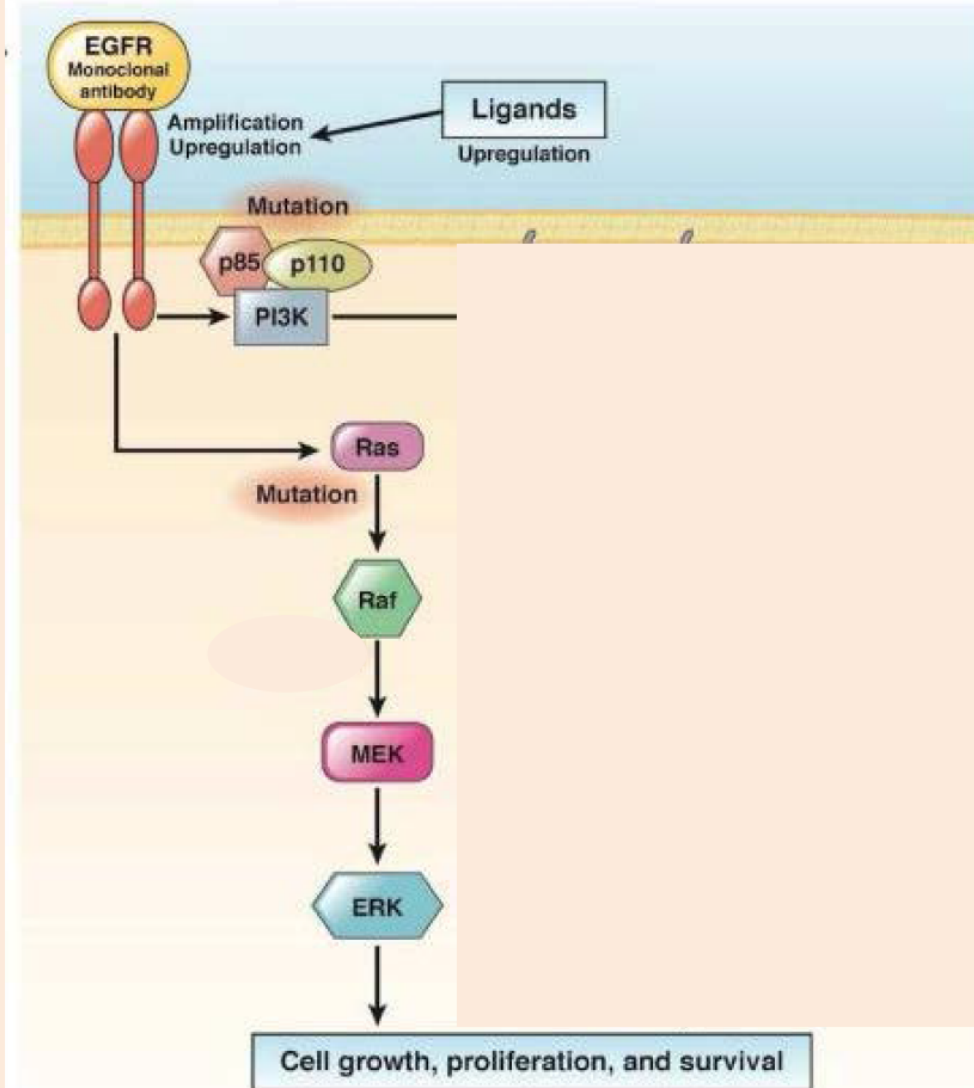
| | Prevalenza | Eventi |
|---|------------|---|
| Instabilità cromosomica (CIN) | 80-85% | Numerosi geni coinvolti nella carcinogenesi intestinale subiscono alterazioni genetiche dovute alla CIN, come EGFR APC , TP53 , KRAS , BRAF , PTEN, SRC, TGF- β , SMAD 2 e 4. |
| Instabilità dei microsatelliti (MSI) | 15-20% | CRC caratterizzati da mutazioni o epimutazioni in geni del sistema di riparazione degli accoppiamenti errati (MMR), con conseguenti inserzioni e/o delezioni nei microsatelliti) |
| Metilazione isole CpG (CIMP) (Metilazione aberrante del DNA) | ~ 20% | CRC caratterizzati da ipermetilazione di isole CpG in multipli promotori (spesso sono associate mutazioni in BRAF) |

Mutazioni del gene BRAF

Il gene *BRAF* codifica per una proteina intracellulare che si trova a valle della proteina Ras, nella stessa via di trasmissione dei segnali proliferativi.

La mutazione del gene *BRAF*, presente in circa il **10%** dei tumori del colon, colpisce principalmente il dominio chinasi (esoni 15 o 11; > 90% delle mutazioni è *BRAF*^{V600E}) ed è mutuamente esclusiva con le mutazioni del gene *RAS*.

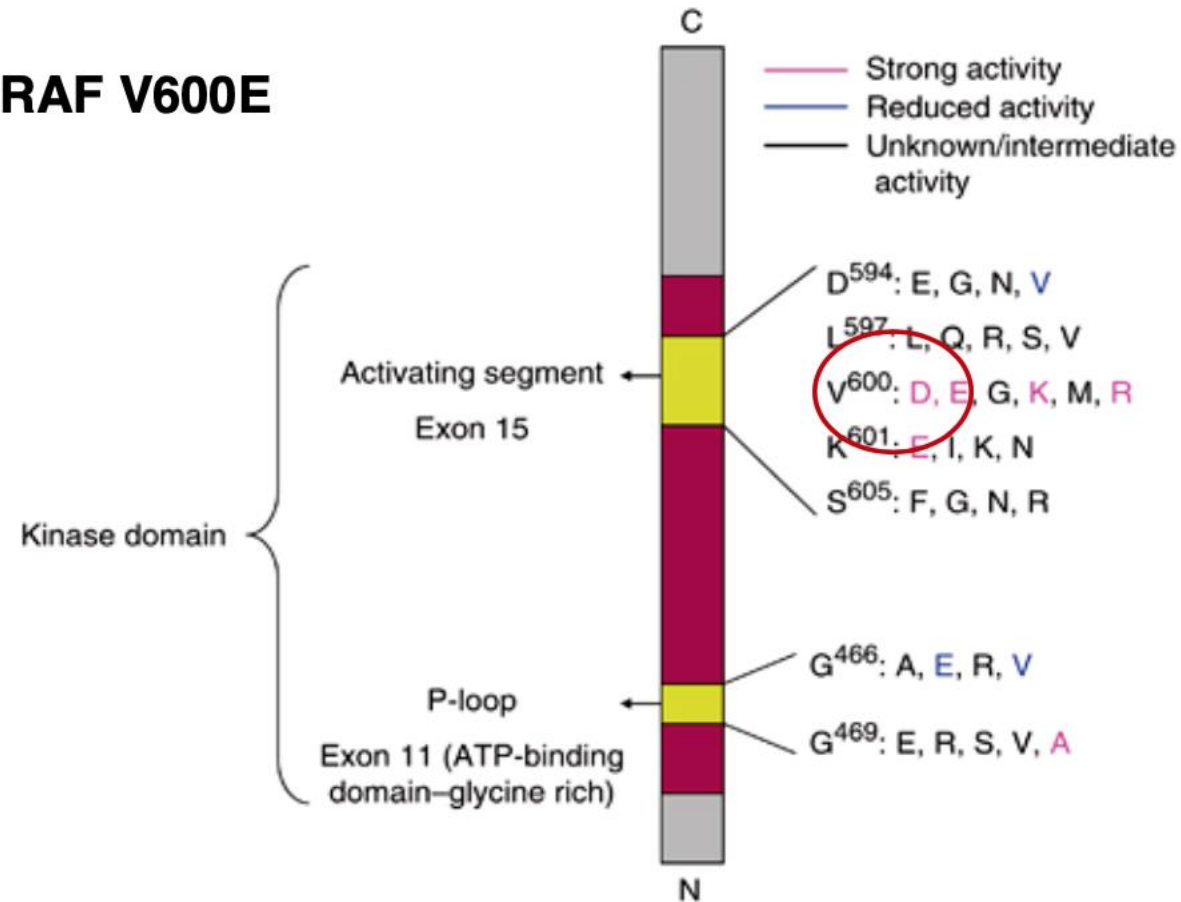
Mutazioni di *BRAF* → prognosi sfavorevole.



Da Carethers and Jung (2015) *Gastroenterology*, 149:1177-90, modificata.

MUTAZIONI BRAF

BRAF V600E



Principali vie di progressione del tumore del colon

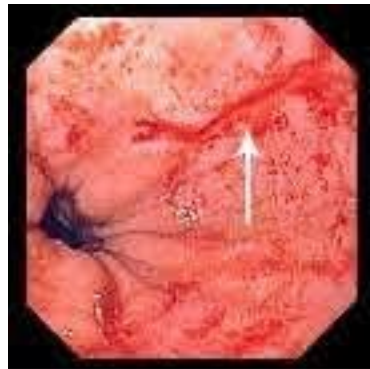
| | Prevalenza | Eventi |
|---|------------|--|
| Instabilità cromosomica (CIN) | 80-85% | CRC caratterizzati da aneuploidia, inattivazione di APC/ β catenina, accumulo mutazioni in oncogeni (p.es. RAS) e geni oncosoppressori (p.es. p53), «perdite» e «guadagni» allelici. |
| Instabilità dei microsatelliti (MSI) | 15-20% | CRC caratterizzati da mutazioni o epimutazioni in geni del sistema di riparazione degli accoppiamenti errati (MMR), con conseguenti inserzioni e/o delezioni nei microsatelliti) |
| Metilazione isole CpG (CIMP) (Metilazione aberrante del DNA) | ~ 20% | CRC caratterizzati da ipermetilazione di isole CpG in multipli promotori (spesso sono associate mutazioni in BRAF) |

L'instabilità legata a microsatelliti (MSI)

I microsatelliti sono brevi sequenze ripetute di DNA presenti normalmente nel genoma umano.

A causa di specifiche mutazioni, i microsatelliti possono diventare in maniera anomala più corti o più lunghi rendendo il DNA instabile.

La MSI si ritrova nel 15% circa dei casi sporadici di cancro del colon, ma rappresenta la principale alterazione genetica (>95%) nella sindrome di Lynch (carcinoma del colon-retto ereditario non poliposico).



Instabilità dei microsatelliti (MSI)

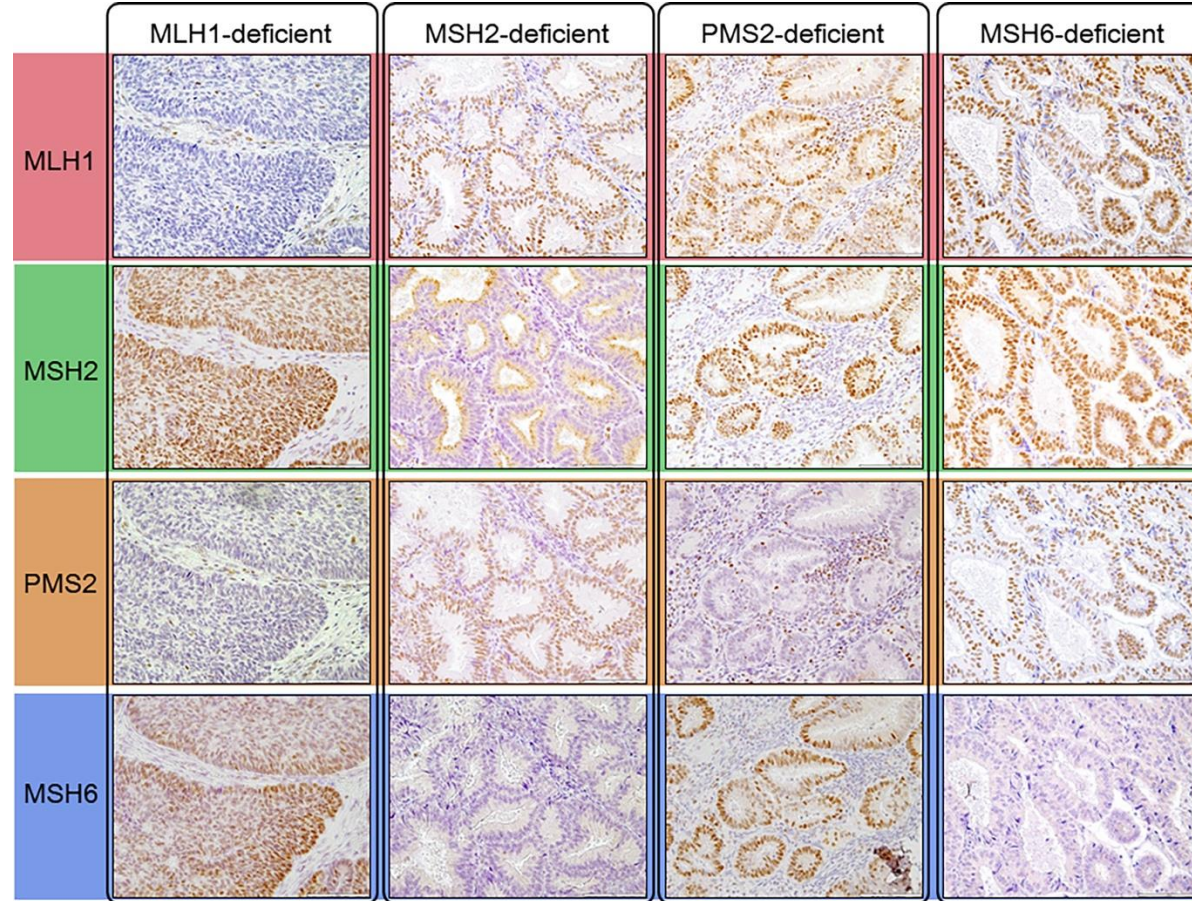
L'instabilità dei microsatelliti è causata da mutazioni o epimutazioni (ipermetilazione del promotore di MLH1 in CRC sporadici) a carico dei geni del mismatch repair (MMR), il sistema deputato alla riparazione di accoppiamenti errati nel DNA.

Tumors with MLH1-deficiency (dMLH1) show negative expression in both MLH1 and PMS2 IHC

those with MSH2-deficiency (dMSH2) show negative expression in both MSH2 and MSH6 IHC

Tumors with PMS2-deficiency (dPMS2) they show negative expression only in PMS2

Tumors with MSH6-deficiency show negative expression only in MSH6.



Test di valutazione dell'instabilità dei microsatelliti

Il test prevede l'analisi di amplificazioni di un pannello di loci microsatelliti, che comprende i loci BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 e D17S250.

La figura mostra i picchi relativi all'amplificazione di **BAT26** e **BAT25** in tre CRC confrontati con il tessuto sano dello stesso individuo.

Il picco con colore pieno è il prodotto principale. La differenza di lunghezza dei prodotti osservati nel tumore (T) rispetto al DNA del tessuto normale (N) è mostrato dalle barre orizzontali. I picchi rossi a sn rappresentano la lunghezza interna standard.

Criteri di definizione:

- MSI-High se instabilità >30% dei loci analizzati
- MSI-Low se instabilità <30% dei loci analizzati
- MSS se assenza di instabilità (caso C nella figura)

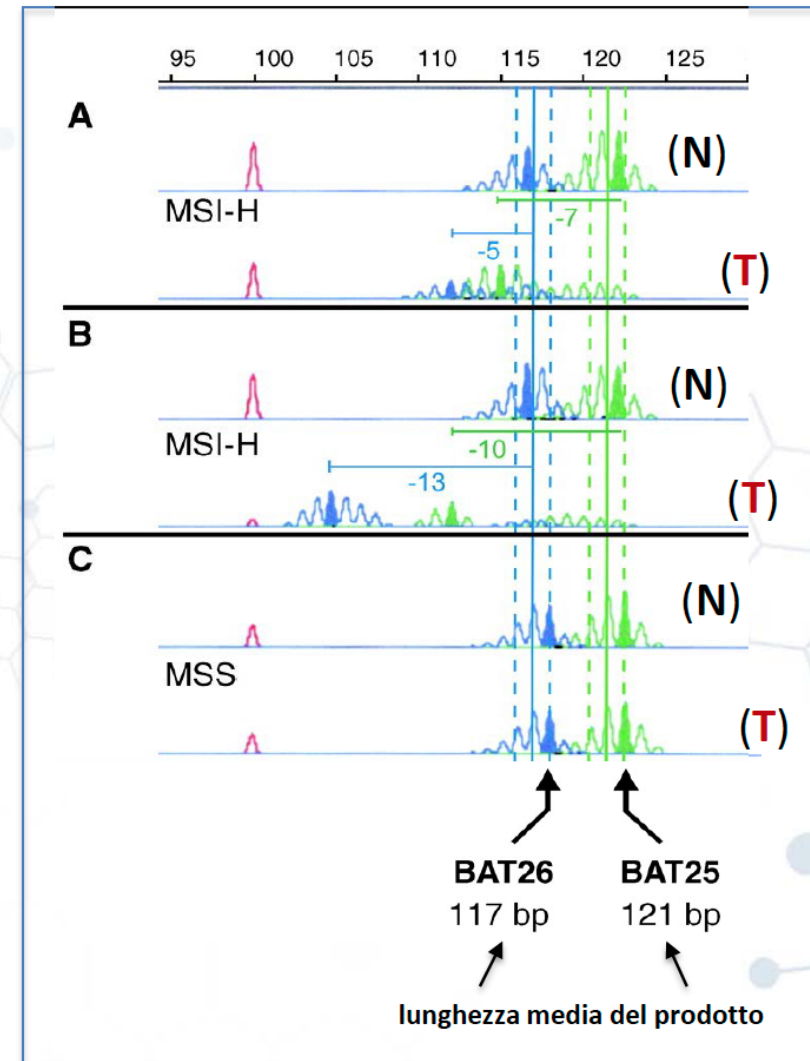


Figura da Findeisen et al. *Cancer Res* 2005;65:8072-8078, modificata

L'instabilità dei microsatelliti rappresenta un marcatore

- **Diagnostico** per la Sindrome di Lynch;
- **Prognostico**: vari studi hanno evidenziato che tumori con MSI hanno una prognosi migliore rispetto a tumori con stabilità dei microsatelliti (MSS); fanno eccezione i tumori con MSI e presenza di mutazione BRAF^{V600E}.

VALORE PREDITTIVO

Pembrolizumab, un **immunoterapico** già ampiamente in uso per molte forme di cancro, si è dimostrato efficace nel trattamento dei tumori del colon metastatici con **instabilità dei microsatelliti**.

Un dato su tutti: grazie a questo approccio è possibile **ridurre** del **40%** il rischio di **progressione della malattia** rispetto alla chemioterapia

La caratterizzazione molecolare nella pratica clinica

Nei pazienti con stadio II e III

presenza di MSI è associata ad una migliore prognosi della malattia

Nei pazienti con carcinoma del colon retto in stadio II la determinazione della MSI potrebbe essere di ausilio nella decisione di somministrare o meno la terapia adiuvante, vista la prognosi estremamente favorevole di questi pazienti.

| | |
|------------|--|
| STADIO II | Neoplasia interessa la parete senza interessamento dei linfonodi |
| STADIO III | Neoplasia interessa la parete con interessamento dei linfonodi |

Principali vie di progressione del tumore del colon

| | Prevalenza | Eventi |
|---|------------|--|
| Instabilità cromosomica (CIN) | 80-85% | CRC caratterizzati da aneuploidia, inattivazione di APC/ β catenina, accumulo mutazioni in oncogeni (p.es. RAS) e geni oncosoppressori (p.es. p53), «perdite» e «guadagni» allelici. |
| Instabilità dei microsatelliti (MSI) | 15-20% | CRC caratterizzati da mutazioni o epimutazioni in geni del sistema di riparazione degli accoppiamenti errati (MMR), con conseguenti inserzioni e/o delezioni nei microsatelliti) |
| Metilazione isole CpG (CIMP) (Metilazione aberrante del DNA) | ~ 20% | CRC caratterizzati da ipermetilazione di isole CpG in multipli promotori (spesso sono associate mutazioni in BRAF) |

3) La metilazione aberrante del DNA

La trascrizione dei geni è regolata da cosiddette sequenze promotrici che regolano il legame dei fattori di trascrizione al gene di interesse.

La metilazione delle sequenze promotrici è un fine meccanismo di regolazione della trascrizione genica, in quanto altera la capacità dei fattori di trascrizione di legarsi ad esse e promuovere la trascrizione.

L'ipermetilazione anomala delle sequenze nucleotidiche dei promotori è frequente nel DNA dei pazienti affetti da CRC. (fenotipo CIMP: CpG island hypermethylation phenotype).

Circa il 20-25% dei CRC hanno un fenotipo CIMP-High, un'altrettanta frazione ha un fenotipo CIMP-Low.

Metilazione isole CpG (CIMP)

Si definisce un tumore al colon di tipo **CIMP** quando si ha ipermetilazione delle isole CpG in ≥ 3 dei 5 geni ***CACNA1G***, ***IGF2***, ***NEUROG1***, ***RUNX3*** e ***SOCS1*** (pannello di riferimento sviluppato da Weisenberger).

La figura mostra la definizione di 5 sottotipi sulla base dello stato di **MSI** e **CIMP** e sulla presenza di mutazioni in ***BRAF*** and ***KRAS***.

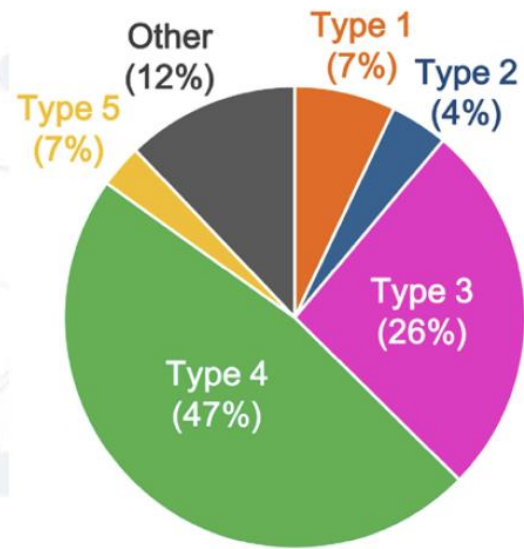


Figura da Inamura K. *Cancers*, 2018; 10:26

