



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

**FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN CHIRURGIA  
(XXIII CICLO)**

***“IL RUOLO DEI FARMACI ANTI-NEOANGIOGENICI  
NEL TRATTAMENTO DELLE METASTASI  
EPATICHE DA CARCINOMA COLO-RETTALE”.***

TUTOR:

**CHIAR.MO PROF.  
ANTONIO BOLOGNESE**

DOTTORANDO:

**DOTT. DARIO PIETRASANTA**

## INDICE

|   |         |
|---|---------|
| INTRODUZIONE                                | PAG. 3  |
| IL CANCRO COLO-RETTALE                      | PAG. 6  |
| LE METASTASI EPATICHE                       | PAG. 21 |
| LA NEOANGIOGENESI TUMORALE                  | PAG. 32 |
| IL BEVACIZUMAB                              | PAG. 44 |
| I CRITERI RECIST                            | PAG. 51 |
| LO STUDIO PERFUSIONALE TC                   | PAG. 57 |
| LA CEUS (CONTRAST-ENHANCED ULTRASONOGRAPHY) | PAG. 68 |
| MATERIALI E METODI                          | PAG. 77 |
| RISULTATI E DISCUSSIONE                     | PAG. 83 |
| CONCLUSIONI                                 | PAG. 94 |
| BIBLIOGRAFIA                                | PAG. 96 |

## INTRODUZIONE

La crescita e la progressione dei tumori solidi presuppongono la necessità che i tumori stessi sviluppino una fitta rete vascolare, in grado di fornire nutrimento ed ossigenazione alle cellule neoplastiche in rapido accrescimento. Tale processo viene indicato col nome di “neoangiogenesi tumorale”, ed è presente, in misura variabile, in tutte le neoplasie solide. La base del processo neoangiogenico risiede nella produzione, da parte delle cellule neoplastiche, di appositi fattori di crescita, primo tra tutti il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), e nell’espressione di specifici recettori di membrana, tra i quali particolare importanza riveste l’Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR).

L’isolamento e la caratterizzazione degli specifici fattori di crescita coinvolti e dei loro recettori, unitamente alla sempre maggiore comprensione dei meccanismi molecolari che sottendono il processo di neoangiogenesi tumorale, hanno portato a prospettare un possibile ruolo di primo piano degli inibitori della neoangiogenesi, i cosiddetti farmaci antiangiogenici, nella lotta alle patologie tumorali. Il concetto di base è relativamente molto semplice: se ogni tumore per accrescersi ha bisogno di

nutrienti che gli vengono forniti mediante i vasi sanguigni che lo circondano, riducendo tale apporto si potrebbe verosimilmente ritardare o addirittura bloccare la crescita neoplastica. E' tuttavia necessario considerare che non tutti i tumori sono uguali per dimensione e per vascolarizzazione: è intuitivo che se un tumore è molto vascolarizzato si può trarre maggior beneficio dall'azione dei fattori antiangiogenici; d'altro canto, quanto maggiori sono le dimensioni di un tumore, tanto minore è in genere la vascolarizzazione al suo interno, il che comporta una minore efficacia del trattamento antiangiogenico

Le molecole utilizzate nell'ambito della cosiddetta "target therapy", primi fra tutti il Bevacizumab (diretto contro il VEGF) ed il Cetuximab (diretto contro l'EGFR), sono ormai di fatto parte integrante dei protocolli terapeutici multi-modali, che prevedono l'associazione della immunoterapia con la chemioterapia (Irinotecan, 5-FU) e con la radioterapia.

La neoangiogenesi può attualmente essere studiata con le nuove tecniche di diagnostica per immagini, grazie allo sviluppo di nuove metodiche che consentono un'acquisizione delle immagini estremamente rapida. In

particolare, è attualmente possibile valutare la perfusione degli organi (e di lesioni focali all'interno di essi) quantificando alcuni parametri, tra cui il Volume ed il Flusso Ematico ed il Tempo Medio di Transito. Gli studi di perfusione possono essere effettuati tanto con la Tomografia Computerizzata e con la Risonanza Magnetica quanto, da qualche anno a questa parte, con le tecniche ecografiche che si avvalgono dell'uso dei mezzi di contrasto ecografici di II generazione (CEUS).

Scopo dello studio è la valutazione della risposta al trattamento con Bevacizumab in pazienti affetti da cancro colo-rettale metastatico, focalizzandosi tanto su parametri clinici e sull'outcome dei pazienti, quanto sulla valutazione della risposta alla terapia, effettuata tramite studi perfusionali TC e CEUS.

## IL CANCRO COLO-RETTALE

Il carcinoma del colon-retto rimane, a tutt'oggi, una delle neoplasie più frequenti, e senza dubbio una delle più letali.

Tuttavia, un'adeguata politica di screening (e il conseguente implemento della diagnosi precoce), una migliore comprensione della biologia e della genetica del tumore, ed il miglioramento delle tecniche chirurgiche e delle terapie mediche hanno portato, negli ultimi anni, ad un sensibile miglioramento della prognosi<sup>1</sup>.

Nei Paesi occidentali il cancro del colon-retto rappresenta il terzo tumore maligno per incidenza e mortalità dopo quello della mammella e quello del polmone nella donna e dopo quello della prostata e quello del polmone nell'uomo<sup>2</sup>. Complessivamente, rappresenta il quarto tumore più frequente in assoluto. La malattia, abbastanza rara prima dei 40 anni, è sempre più frequente a partire dai 60 anni e raggiunge il picco massimo verso gli 80 anni<sup>3</sup>; inoltre, l'incidenza appare essere lievemente maggiore negli uomini, con un rapporto maschi:femmine di circa 1,35:1<sup>1-4</sup>.

Secondo i dati del programma SEER (Surveillance, Epidemiology and End

Results)<sup>5</sup> del National Cancer Institute (NCI) di Bethesda (US), per i casi diagnosticati fra il 2004 e il 2008 l'età media alla diagnosi era di circa 70 anni, con un'incidenza direttamente proporzionale all'aumentare dell'età ed un picco massimo fra i 75 e gli 84 anni. L'incidenza complessiva, aggiustata per età, è stata di 47,2 casi per 100.000 abitanti (55/100.000 per gli uomini, 41/100.000 per le donne), con una frequenza maggiore nei soggetti di colore e minore negli ispanici.

Sempre per il periodo di riferimento 2004 – 2008, la mortalità complessiva, aggiustata per età, è stata di circa 17,1 casi per 100.000 abitanti (20.7/100.000 per gli uomini, 14.5/100.000 per le donne, con un rapporto maschi:femmine di circa 1,43:1), con un'età media al decesso di circa 75 anni; anche in questo caso, l'andamento è stato direttamente proporzionale all'aumentare dell'età con un picco massimo fra i 75 e gli 84 anni.

E' importante sottolineare, però, che il trend nei tassi di incidenza, espresso come variazione di percentuale annua (Annual Percentage Change, APC), è stato, per il decennio 1999 – 2008, significativamente negativo (APC: -2.4%); parallelamente, si è verificata una riduzione significativa della mortalità (APC: -4.1% per il periodo 2002 – 2005; -2.0% per il periodo 2005 – 2008). **(Fig. 1)** Probabilmente, come ricordato sopra, questi dati

sono espressione, da un lato, dell'importante implementazione nelle politiche di screening e di informazione, e dall'altro dei grandi progressi scientifici degli ultimi anni, che hanno permesso di aumentare significativamente la sopravvivenza dei pazienti affetti da cancro coloretale.

In Italia, l'incidenza stimata si attesta intorno ai 60,2 casi ogni 100.000 uomini e 50,3 ogni 100.000 donne. Complessivamente, si contano quasi 38.000 nuovi casi l'anno (quasi 20.500 per gli uomini e quasi 17.300 per le donne), mentre, per quanto riguarda la mortalità, si stimano all'incirca 12.500 decessi l'anno<sup>6</sup>. **(Fig. 2)**

Secondo i dati dell'Associazione Italiana Registri Tumori (AIRT)<sup>7</sup>, nel periodo 1998-2002 il tumore del colon-retto è risultato essere il 5° per frequenza tra le neoplasie diagnosticate negli uomini e il 3° tra quelle diagnosticate nelle donne, rappresentando rispettivamente il 7,7% e l'8,2% del totale dei tumori. Per quanto concerne la mortalità, invece, ha rappresentato la quarta causa di morte per tumore in ordine di importanza sia fra gli uomini (7,3% di tutti i decessi) sia fra le donne (9,1%).

Il rischio di avere una diagnosi di tumore del colon nel corso della vita (fra

0 e 74 anni) è di 34,3‰ fra i maschi (1 caso ogni 29 uomini) e di circa 22,2‰ fra le femmine (1 caso ogni 45 donne), mentre il rischio di morire a causa di questo tumore è di 12,1‰ fra i maschi e 7,4‰ fra le femmine. Esiste una certa variabilità geografica nell'incidenza del tumore del colon nel nostro Paese, con un rapporto fra le aree con i tassi più alti e quelle con i più bassi, generalmente quelle dell'Italia meridionale e insulare, di circa 2 sia fra gli uomini sia fra le donne. Le differenze nell'incidenza possono essere influenzate dalle pratiche di screening che si stanno diffondendo in diverse regioni italiane.

Per quanto riguarda gli andamenti nel tempo, a differenza di quanto avviene negli Stati Uniti il tumore del colon mostra una tendenza all'aumento dell'incidenza; la mortalità è invece in riduzione in entrambi i sessi.

Molte sono le cause che concorrono a determinare la malattia: tra esse ne sono state individuate alcune legate alla dieta e all'alimentazione, altre genetiche, e altre di tipo non ereditario.

**Fattori nutrizionali:** molti studi dimostrano che una dieta ad alto contenuto di calorie, ricca di grassi animali e proteine (che provoca a sua

volta il rilascio nell'intestino di grandi quantità di acidi biliari) e povera di fibre, è associata a un aumento dei tumori intestinali; viceversa, diete ricche di fibre (cioè caratterizzate da un alto consumo di frutta e vegetali) sembrano avere un ruolo protettivo. L'effetto protettivo delle fibre è stato ipotizzato in base all'osservazione che le popolazioni vegetariane hanno un'incidenza di carcinoma del colon-retto ridotta del 30 per cento circa<sup>8</sup>.

**Fattori genetici:** il tumore del colon-retto è una delle neoplasie con maggiore connotazione eredo-familiare<sup>9</sup>. Esistono numerose patologie ereditarie che predispongono all'insorgenza del carcinoma del colon-retto; tra queste sono da segnalare le poliposi adenomatose ereditarie (tra cui l'Adenomatosi Poliposa Familiare, o FAP; la Poliposi Associata al gene MYH, o MAP; la sindrome di Gardner; la sindrome di Turcot) e la cosiddetta Carcinosi Ereditaria del Colon-retto su base Non Poliposica (HNPCC), o sindrome di Lynch, nelle sue varianti I (non associata ad altri tumori) e II (associata ad altre neoplasie, particolarmente ginecologiche, gastriche e delle vie biliari). Tuttavia, anche il carcinoma colico cosiddetto "sporadico" mostra una spiccata familiarità: si stima che il rischio di sviluppare un tumore del colon aumenti di 2 o 3 volte nei parenti di primo grado di una persona affetta da cancro o da polipi del grosso intestino<sup>9,10</sup>.

**Fattori non ereditari:** sono importanti l'età (l'incidenza è 10 volte superiore tra le persone di età compresa tra i 60 e i 64 anni rispetto a coloro che hanno 40-44 anni)<sup>9</sup>, le malattie infiammatorie croniche intestinali (tra le quali la Retto-Colite Ulcerosa e il morbo di Crohn)<sup>11,12</sup>, una storia clinica passata di polipi del colon o di un pregresso tumore del colon-retto. Anche una pregressa irradiazione della regione pelvica può predisporre allo sviluppo di un carcinoma colo-rettale<sup>9</sup>.

**La maggior parte dei tumori del colon-retto deriva dalla trasformazione maligna di polipi adenomatosi (“sequenza adenoma – carcinoma”)<sup>13</sup>, che costituiscono, pertanto, una lesione precancerosa. Nella maggior parte dei casi i polipi non danno sintomi; solo nel 5% dei casi possono dar luogo a piccole perdite di sangue, rilevabili con un esame delle feci per la ricerca del cosiddetto "sangue occulto".**

La probabilità che un polipo del colon si evolva verso una forma invasiva di cancro dipende dalla dimensione del polipo stesso: è minima (inferiore al 2%) per dimensioni inferiori a 1,5 cm, intermedia (2 – 10%) per dimensioni di 1,5 – 2,5 cm e significativa (10%) per dimensioni maggiori di 2,5 cm<sup>14</sup>.

Age-Adjusted SEER Incidence Rates and Trends for the Top 15 Cancer Sites  
Both Sexes by Race/Ethnicity

| Primary Site            | Age-Adjusted Rate, 2004-2008 | Trend (APC), 1999-2008 |
|-------------------------|------------------------------|------------------------|
| All Sites               | 464.4                        | -0.7*                  |
| Prostate                | 69.7                         | -1.6*                  |
| Breast                  | 67.0                         | -1.4*                  |
| Lung and Bronchus       | 62.0                         | -1.3*                  |
| Colon and Rectum        | 47.2                         | -2.4*                  |
| Urinary Bladder         | 21.1                         | -0.4*                  |
| Melanoma of the Skin    | 20.8                         | 1.9*                   |
| Non-Hodgkin Lymphoma    | 19.8                         | 0.2                    |
| Kidney and Renal Pelvis | 14.6                         | 3.0*                   |
| Corpus and Uterus, NOS  | 12.8                         | -0.1                   |
| Leukemia                | 12.5                         | -0.4                   |
| Pancreas                | 12.0                         | 1.1*                   |
| Thyroid                 | 11.0                         | 6.2*                   |
| Oral Cavity and Pharynx | 10.6                         | -0.4                   |
| Stomach                 | 7.7                          | -1.6*                  |
| Liver & IBD             | 7.3                          | 3.0*                   |

Trends in SEER Incidence Rates

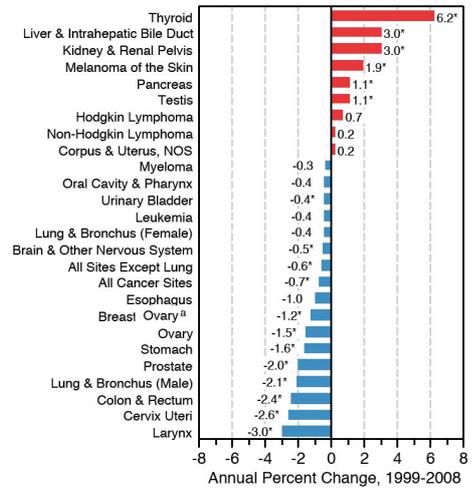


Fig. 1 – Tassi di incidenza ed Annual Percentage Change dei principali tumori (dati SEER).

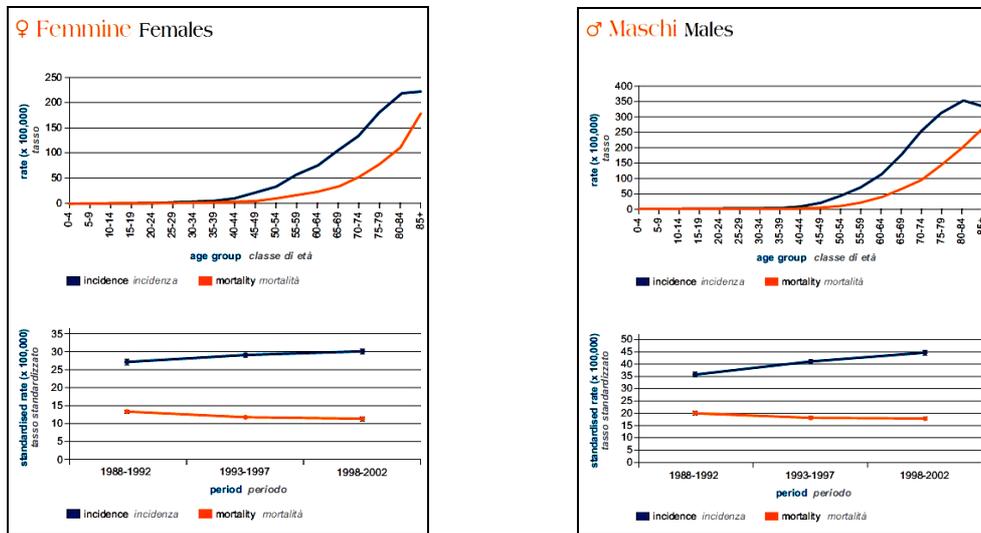


Fig. 2 – Tassi di incidenza e mortalità per cancro del colon in Italia (dati AIRTUM)

Il tumore del colon-retto si manifesta, nella metà dei casi, nel sigma (ovvero nell'ultima parte del colon vero e proprio) e nel retto; in un quarto di malati è il colon ascendente a essere colpito, mentre la localizzazione della malattia nel colon trasverso e in quello discendente si verifica in un caso su cinque circa<sup>14</sup>.

L'istotipo più frequente di tumore del grosso intestino è rappresentato dall'adenocarcinoma, che rende conto del 90-95% di tutti i tumori del colon. L'adenocarcinoma colloidale o mucinoso rappresenta circa il 17% dei tumori del grosso intestino. Queste varianti di adenocarcinoma sono caratterizzate dalla grande quantità di mucina extracellulare conservata all'interno del tumore. Una classificazione a parte merita il raro carcinoma a cellule ad anello con castone (2-4% dei carcinomi mucosi), che contiene mucina intracellulare che spinge il nucleo verso un lato della cellula. Alcuni tumori a cellule ad anello con castone si presentano come liniti neoplastiche, che si diffondono a livello intramurale ma generalmente non coinvolgono la mucosa. Altre rare varianti di tumori epiteliali includono carcinomi a cellule squamose e carcinomi adenosquamosi. Esistono, infine, i carcinomi indifferenziati, che non contengono strutture ghiandolari o altre peculiarità quali le secrezioni mucose.

Esistono diversi sistemi classificativi per esprimere il grading delle neoplasie colo-rettali. Tra questi, i sistemi più utilizzati sono quello di Broders e quello di Dukes. Nel sistema classificativo di Broders sono descritti quattro gradi basati sulla percentuale di cellule tumorali differenziate. Per tumori ben differenziati si intendono strutture ghiandolari ben formate rassomiglianti ad adenomi. Broders include nella classificazione i carcinomi mucinosi che, al contrario, la classificazione di Dukes considera separatamente. A causa della pessima prognosi correlata all'istotipo carcinoma mucinoso, altri autori preferiscono raggrupparlo con le neoplasie maggiormente indifferenziate. Il sistema di grading di Dukes considera la disposizione delle cellule piuttosto che la percentuale delle cellule differenziate. L'iniziale approccio di Dukes si è successivamente evoluto in un sistema a tre gradi che è attualmente quello maggiormente utilizzato. Per Grado 1 si intendono le forme meglio differenziate, con tubuli ben formati e il minimo di polimorfismi nucleari e di mitosi. Il Grado 3 definisce le neoplasie meno differenziate con solo occasionali strutture ghiandolari, cellule pleomorfiche e un'alta incidenza di mitosi. Il Grado 2 rappresenta l'intermedio fra Grado 1 e 3.

Un importante sforzo è stato compiuto nella ricerca di marcatori sierologici

che potrebbero consentire un riscontro e una diagnosi precoci del tumore del colon-retto. Numerose proteine, glicoproteine e sostanze cellulari ed umorali sono state studiate quali potenziali marcatori tumorali ma nessuna ha dimostrato di essere specifica per il tumore del colon-retto. Il marcatore maggiormente studiato, denominato **CEA** (antigene carcinoembrionario), ha una scarsa utilità nella diagnosi precoce e nello screening, in quanto possiede una bassa sensibilità nel rilevare tumori allo stadio iniziale: la sensibilità per lesioni allo stadio A e B di Dukes è del 36% rispetto al 74% per gli stadi C e D nel caso in cui il livello soglia del marcatore sia fissato a 2.5 mg/ml. Il CEA può invece essere importante nella stadiazione preoperatoria e nel follow-up post-chirurgico dei pazienti, in quanto la sua concentrazione è direttamente collegata all'estensione del cancro. Il CEA è anche utile nel monitoraggio della risposta al trattamento farmacologico (scende, infatti, se la chemioterapia è efficace) o per la verifica della ripresa della malattia (risale in caso di ricadute). Tra gli altri marcatori di uso comune va ricordato l'antigene carboidratico **CA 19.9**, detto anche GIIA.

I sintomi causati da un cancro del colon-retto sono molto variabili e possono essere per lungo tempo assenti. La loro insorgenza e tipologia sono condizionate da diversi fattori, quali la sede del tumore, la sua

estensione e la presenza o meno di ostruzioni o emorragie: ciò fa sì che le manifestazioni del cancro siano sovente sovrapponibili a quelle di molte altre malattie addominali o intestinali. Per questo sintomi precoci, vaghi e saltuari quali la stanchezza e la mancanza di appetito, e altri più gravi come l'anemia e la perdita di peso, sono spesso trascurati dal paziente. Talora una stitichezza ostinata, alternata a diarrea, può costituire un primo campanello d'allarme.

Come la maggior parte delle neoplasie, i tumori del colon-retto vengono classificati secondo lo schema TNM, elaborato congiuntamente dall'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) e dall'American Joint Committee on Cancer (AJCC) e giunto, nel 2009, alla sua settima edizione<sup>15</sup>. Sebbene più antico, accanto al TNM viene ancora utilizzato da alcuni scienziati il sistema stadiativo proposto da Dukes, e modificato successivamente da Astler e Coller. I due sistemi sono riassunti nella figura della pagina seguente.

E' ormai nozione comune che, per una efficace definizione dello stato linfonodale, dovrebbero essere prelevati ed esaminati almeno 12 linfonodi. Ciò è particolarmente importante per una corretta stratificazione dei

pazienti nello stadio II (pN0) o nello stadio III (pN+), e, quindi, per le scelte terapeutiche che vengono prese in conseguenza di tale stratificazione: pazienti con un numero inadeguato di linfonodi repertati potrebbero andare incontro al fenomeno dello “stage migration”, ovvero essere erroneamente stratificati in uno stadio piuttosto che in un altro, e, di conseguenza, ricevere un trattamento adiuvante inappropriato o meno efficace. Il ridotto numero di linfonodi rinvenuti in alcuni preparati chirurgici potrebbe ascrivere ad un problema chirurgico (mancata asportazione di un numero sufficiente di linfonodi) o anatomo-patologico (mancato reperimento di un adeguato numero di linfonodi a causa di errori metodologici nella preparazione del pezzo anatomico). Tuttavia, diversi altri fattori possono influenzare il numero di linfonodi repertati: sede della lesione (in genere si trova un maggior numero di linfonodi nelle emicolectomie destre), pregressa terapia neoadiuvante, età avanzata, obesità, stato immunitario del paziente. Alcuni Autori hanno proposto di affiancare, al numero assoluto di linfonodi metastatici, anche il cosiddetto “Lymph Node Ratio”, ovvero il rapporto tra linfonodi metastatici e linfonodi repertati, come già avviene per il cancro dello stomaco<sup>16,17</sup>; tale ipotesi ha suscitato, però, pareri contrastanti.

La prognosi del tumore del colon-retto è chiaramente correlata al grado di penetrazione della neoplasia attraverso la parete del viscere e alla presenza o assenza di coinvolgimento linfonodale. Altri rilevanti parametri supplementari sono il grading, l'invasione venosa o vascolare e l'invasione perineurale, la risposta infiammatoria linfoide e la presenza di interessamento tumorale del margine di resezione che la classificazione di Dukes e TNM non prendono in considerazione. Nel tumore del retto l'interessamento dei margini radiali (lateral) e la completa escissione del mesoretto nei segmenti del terzo medio ed inferiore devono essere considerati quali verosimili ulteriori fattori prognostici. L'occlusione e la perforazione intestinale sono indicatori clinici di cattiva prognosi. Elevati livelli sierici pre-trattamento di antigene carcinoembrionario (CEA) e di antigene carboidratico 19-9 (CA 19-9) rivestono un significato prognostico negativo.

Secondo un recente studio, condotto sui dati del programma SEER e basato sulla sesta edizione del Sistema TNM, la sopravvivenza complessiva a cinque anni dei pazienti affetti da cancro del colon si attesta intorno al 65,2% dei casi<sup>18</sup>. Ovviamente, questa percentuale varia notevolmente

quando si analizza la sopravvivenza stadio-specifica, passando dal 93,2% dei pazienti in stadio I all'8,1% dei pazienti in stadio IV. Un dato che è interessante sottolineare è come, da questa stratificazione, emerga una prognosi significativamente migliore per i pazienti in stadio IIIa (83,4%) rispetto a quelli in stadio IIb (72,2%). Questo è probabilmente da mettere in relazione con la pratica clinica, vigente fino a pochi anni fa, di non somministrare terapie adiuvanti ai pazienti in stadio II, come da linee-guida NIH<sup>19</sup>; altre possibili spiegazioni alla base di questo fenomeno possono risiedere in una “stage migration” da inadeguata valutazione dell’N, o in una resezione non R0 dovuta alle dimensioni del tumore primitivo. Sebbene l’argomento rimanga a tutt’oggi dibattuto, dopo la pubblicazione dei risultati dello studio “MOSAIC”<sup>20</sup> l’atteggiamento generale dei clinici tende a stratificare i pazienti in stadio II per fattori di rischio (grading, invasione vascolare e perineurale, instabilità micro satellitare, etc) ed a sottoporre a terapia adiuvante i pazienti considerati ad alto rischio di ricaduta.

## Definitions

### Primary Tumor (T)

- TX** Primary tumor cannot be assessed
- T0** No evidence of primary tumor
- Tis** Carcinoma in situ: intraepithelial or invasion of lamina propria<sup>1</sup>
- T1** Tumor invades submucosa
- T2** Tumor invades muscularis propria
- T3** Tumor invades through the muscularis propria into pericolorectal tissues
- T4a** Tumor penetrates to the surface of the visceral peritoneum<sup>2</sup>
- T4b** Tumor directly invades or is adherent to other organs or structures<sup>2,3</sup>



### Regional Lymph Nodes (N)<sup>4</sup>

- NX** Regional lymph nodes cannot be assessed
- N0** No regional lymph node metastasis
- N1** Metastasis in 1–3 regional lymph nodes
- N1a** Metastasis in one regional lymph node
- N1b** Metastasis in 2–3 regional lymph nodes
- N1c** Tumor deposit(s) in the subserosa, mesentery, or nonperitonealized pericolic or perirectal tissues without regional nodal metastasis
- N2** Metastasis in 4 or more regional lymph nodes
- N2a** Metastasis in 4–6 regional lymph nodes
- N2b** Metastasis in 7 or more regional lymph nodes

### Distant Metastasis (M)

- M0** No distant metastasis
- M1** Distant metastasis
- M1a** Metastasis confined to one organ or site (for example, liver, lung, ovary, nonregional node)
- M1b** Metastases in more than one organ/site or the peritoneum

| ANATOMIC STAGE/PROGNOSTIC GROUPS |        |        |     |        |       |
|----------------------------------|--------|--------|-----|--------|-------|
| Stage                            | T      | N      | M   | Dukes* | MAC*  |
| 0                                | Tis    | N0     | M0  | –      | –     |
| I                                | T1     | N0     | M0  | A      | A     |
|                                  | T2     | N0     | M0  | A      | B1    |
| IIA                              | T3     | N0     | M0  | B      | B2    |
| IIB                              | T4a    | N0     | M0  | B      | B2    |
| IIC                              | T4b    | N0     | M0  | B      | B3    |
| IIIA                             | T1–T2  | N1/N1c | M0  | C      | C1    |
|                                  | T1     | N2a    | M0  | C      | C1    |
| IIIB                             | T3–T4a | N1/N1c | M0  | C      | C2    |
|                                  | T2–T3  | N2a    | M0  | C      | C1/C2 |
|                                  | T1–T2  | N2b    | M0  | C      | C1    |
| IIIC                             | T4a    | N2a    | M0  | C      | C2    |
|                                  | T3–T4a | N2b    | M0  | C      | C2    |
|                                  | T4b    | N1–N2  | M0  | C      | C3    |
| IVA                              | Any T  | Any N  | M1a | –      | –     |
| IVB                              | Any T  | Any N  | M1b | –      | –     |

NOTE: cTNM is the clinical classification, pTNM is the pathologic classification. The y prefix is used for those cancers that are classified after neoadjuvant pretreatment (for example, ypTNM). Patients who have a complete pathologic response are ypT0N0cM0 that may be similar to Stage Group 0 or I. The r prefix is to be used for those cancers that have recurred after a disease-free interval (rTNM).  
\* Dukes B is a composite of better (T3 N0 M0) and worse (T4 N0 M0) prognostic groups, as is Dukes C (any TN1 M0 and Any T N2 M0). MAC is the modified Astler-Coller classification.

## Notes

- <sup>1</sup> Tis includes cancer cells confined within the glandular basement membrane (intraepithelial) or mucosal lamina propria (intramucosal) with no extension through the muscularis mucosae into the submucosa.
- <sup>2</sup> Direct invasion in T4 includes invasion of other organs or other segments of the colorectum as a result of direct extension through the serosa, as confirmed on microscopic examination (for example, invasion of the sigmoid colon by a carcinoma of the cecum) or, for cancers in a retroperitoneal or subperitoneal location, direct invasion of other organs or structures by virtue of extension beyond the muscularis propria (that is, a tumor on the posterior wall of the descending colon invading the left kidney or lateral abdominal wall; or a mid or distal rectal cancer with invasion of prostate, seminal vesicles, cervix, or vagina).
- <sup>3</sup> Tumor that is adherent to other organs or structures, grossly, is classified cT4b. However, if no tumor is present in the adhesion, microscopically, the classification should be pT1–4a depending on the anatomical depth of wall invasion. The V and L classifications should be used to identify the presence or absence of vascular or lymphatic invasion, whereas the PN site-specific factor should be used for perineural invasion.
- <sup>4</sup> A satellite peritumoral nodule in the pericolorectal adipose tissue of a primary carcinoma without histologic evidence of residual lymph node in the nodule may represent discontinuous spread, venous invasion with extravascular spread (V1/2), or a totally replaced lymph node (N1/2). Replaced nodes should be counted separately as positive nodes in the N category, whereas discontinuous spread or venous invasion should be classified and counted in the Site-Specific Factor category Tumor Deposits (TD).

## LE METASTASI EPATICHE

Com'è noto, i nutrienti e l'acqua assorbiti a livello della mucosa intestinale vengono immessi nel sangue venoso refluo e convogliati al fegato attraverso il circolo portale. Il fegato rappresenta, pertanto, il primo organo incontrato da eventuali cellule tumorali circolanti diffuse a partire da un tumore primitivo del colon-retto, e, proprio per questo, l'organo più frequentemente sede di metastasi. Oltre il 50% dei pazienti affetti da carcinoma colo-rettale svilupperà un coinvolgimento epatico secondario nel corso della malattia<sup>21,22</sup>. Le metastasi epatiche sono sincrone, ovvero già presenti al momento della diagnosi o evidenziati entro sei mesi dalla stessa, in una percentuale di pazienti compresa tra il 20 e il 34%<sup>23,24</sup>. D'altra parte, quasi la metà dei pazienti sottoposti a chirurgia per carcinoma coloretale primitivo sviluppa successivamente metastasi epatiche metacrone<sup>25</sup>. È stato stimato che oltre la metà dei pazienti che muoiono per cancro coloretale presenta ripetizioni epatiche all'autopsia, e che le metastasi epatiche rappresentano la causa di morte nella maggior parte di questi pazienti<sup>26</sup>.

Senza alcun trattamento, i pazienti con metastasi epatiche da cancro coloretale mostrano una sopravvivenza media variabile tra i 5 e i 20 mesi; la

sopravvivenza a due anni è aneddotica, quella a cinque anni estremamente rara<sup>23,25,27-29</sup>. La prognosi è, ovviamente, strettamente correlata all'estensione della malattia intraepatica (sopravvivenza a un anno variabile tra il 5,7%, nei pazienti con malattia epatica diffusa, e il 60%, nei pazienti con lesione singola), ma anche alla presenza di malattia extraepatica ed all'età del paziente<sup>23,30</sup>.

La sola chemioterapia ha di per sé un ruolo palliativo se non abbinata a procedure resettive o ablative, e raramente apporta dei benefici in termini di sopravvivenza. Numerosi studi retrospettivi e comparativi indicano che la resezione epatica è l'unica strategia terapeutica a permettere una sopravvivenza a lungo termine: tali studi hanno evidenziato una sopravvivenza nettamente maggiore per i pazienti sottoposti a resezione rispetto a quelli potenzialmente resecabili ma non sottoposti ad intervento<sup>31,32</sup>. Il tasso di sopravvivenza a cinque anni è praticamente raddoppiato nelle ultime due decadi: nelle varie casistiche, tale percentuale varia tra il 21 ed il 50% dei pazienti sottoposti a terapia resettiva, con punte del 70% in taluni lavori<sup>28,33-36</sup>. D'altro canto, se in passato solo il 5 – 10% dei pazienti presentava caratteristiche tali da rendere possibile una resezione epatica, i recenti progressi avvenuti nelle varie discipline

coinvolte nella gestione multimodale del paziente con malattia metastatica al fegato (oncologia medica, chemioterapia, diagnostica, radiologia interventistica, radioterapia, e non ultima la chirurgia) hanno portato ad una ridefinizione dei criteri di reseccabilità delle metastasi epatiche, elevando la succitata percentuale al 20 – 25%<sup>37,38</sup>.

Le resezioni epatiche vengono definite “tipiche”, o “anatomiche”, se vengono effettuate seguendo i criteri anatomici di suddivisione del fegato in unità funzionali segmentarie; queste resezioni possono essere “regolate” o “non regolate”, a seconda che vengano o meno eseguite sulla guida di un preventivo controllo delle afferenze vascolari dei segmenti interessati. Le resezioni “atipiche”, o “wedge resections”, consistono invece nell’asportazione della porzione di parenchima epatico contenente le lesioni, eseguita seguendo criteri non anatomici<sup>39</sup>. Particolarmente in quest’ultimo caso, l’utilizzo dell’ecografia intraoperatoria rappresenta un validissimo ausilio per il chirurgo, permettendo di regolare la resezione sulla reale estensione della malattia e sulla presenza di strutture nobili adiacenti.

Accanto all’exeresi chirurgica, esistono diverse tecniche ablativo che possono essere utilizzate da sole, con finalità palliative, ovvero in

combinazione con la chirurgia resettiva, al fine di effettuare un trattamento curativo. Tra queste, le tecniche più utilizzate sono la termoablazione con radiofrequenze (RFA) e quella con microonde (MWA). La RFA, nello specifico, produce una necrosi coagulativa erogando corrente alternata ad alta frequenza attraverso un elettrodo posizionato al centro della lesione; tale corrente produce temperature prossime o superiori ai 100°, che determinano una distruzione del tessuto tumorale e del parenchima circostanti ed una trombosi del microcircolo locale<sup>21,40</sup>. La MWA si basa sullo stesso principio, ma utilizza le microonde per produrre la necrosi delle strutture circostanti. Entrambe le metodiche sono indicate per lesioni non superiori a 5 cm di diametro<sup>40</sup>. Se usate in combinazione con la chirurgia resettiva, queste procedure permettono al chirurgo di asportare le lesioni maggiori e/o le porzioni di parenchima più colpite, e di ablare contestualmente eventuali piccole lesioni residue non asportabili chirurgicamente (per motivi anatomici o connessi con la funzione epatica residua), ottenendo così uno stato R0. Secondo alcuni Autori<sup>21,40</sup>, le metodiche ablativo potrebbero rappresentare una valida alternativa alla chirurgia resettiva nei casi di lesioni secondarie singole di diametro non superiore ai 3 cm, con il vantaggio di una minore invasività ed una più

bassa morbilità. Tuttavia, la RFA e la MWA sembrano presentare un tasso di recidiva locale maggiore ed una disease-free survival minore rispetto alla chirurgia resettiva; pertanto non dovrebbero di per sé rappresentare un'alternativa alla chirurgia effettuata con intento curativo, ma piuttosto un complemento della stessa, ovvero un'opzione da riservare a pazienti in condizioni generali scadute.

Indubbiamente, un approccio chirurgico al paziente con malattia secondaria epatica prevede un accurato e meticoloso studio preoperatorio, volto ad evidenziare o escludere focolai extraepatici di malattia, ad ottenere la miglior definizione anatomica possibile delle lesioni nel contesto del parenchima epatico e dei loro rapporti con le strutture nobili, ad effettuare una stima del parenchima residuo dopo una eventuale procedura resettiva<sup>21,41</sup>. Lo studio preoperatorio si basa generalmente sull'utilizzo delle moderne metodiche di imaging (TC multistrato, ecografia con o senza mezzo di contrasto, RM, PET) integrate tra loro. Anche la laparoscopia diagnostica con eventuale biopsia, specie se abbinata ad una ecografia intraoperatoria, può rappresentare una valida metodica di staging, specialmente nel caso in cui le informazioni fornite dalle metodiche di imaging risultino insufficienti o dubbie.

Fino a qualche anno fa, i criteri di reseccabilità prendevano in considerazione numerosi fattori, quali il numero e le dimensioni delle ripetizioni epatiche, il numero di segmenti coinvolti, l'ampiezza del margine di resezione, l'eventuale coinvolgimento di strutture vascolari e biliari, la presenza di malattia extra-epatica. Attualmente, invece, i suddetti criteri sono andati notevolmente semplificandosi, ed un numero sempre maggiore di pazienti viene giudicato suscettibile di trattamento resettivo<sup>34,39,41-44</sup>. Secondo le definizioni più comuni (tra cui quella della Société Française de Chirurgie Digestive con la Association de Chirurgie Hepato-Biliaire et de Transplantation Hepatique<sup>44</sup> e quella del National Comprehensive Cancer Network<sup>41</sup>), sono reseccabili le lesioni epatiche che possono essere asportate completamente, con margini microscopicamente indenni (R0), senza compromettere la funzionalità epatica residua, né la vascolarizzazione e il drenaggio biliare dei segmenti restanti, ed in assenza di malattia extraepatica non reseccabile. Esistono diverse opinioni in merito alla percentuale minima necessaria di fegato residuo rispetto al volume totale dell'organo<sup>21,41,44,45</sup>; sempre secondo la definizione francese, comunque, il valore cui si fa più frequentemente riferimento è di almeno il

25% nel paziente sano, almeno il 30% nel paziente precedentemente sottoposto a chemioterapia, e almeno il 40% nei pazienti con epatopatia sottostante. Tutti gli esperti sono comunque concordi nel raccomandare l'esecuzione di procedure resettive, ablative o combinate solo quando l'obiettivo di tali procedure sia di ottenere una completa resezione/ablazione di tutte le localizzazioni di malattia note<sup>41,44,45</sup>.

In base ai succitati criteri, le metastasi vengono generalmente suddivise in due gruppi: "resecabili", se possiedono d'emblée i requisiti di resecabilità descritti; "non resecabili", se non li possiedono. Tra queste ultime, vengono definite come "potenzialmente resecabili" quelle lesioni che, seppur inizialmente non resecabili, potrebbero diventarlo in seguito all'esecuzione di procedure mirate ad ottenere un downsizing delle lesioni (chemioterapia preoperatoria) e/o un incremento della funzionalità epatica residua (embolizzazione portale).

L'embolizzazione selettiva dei vasi portalici consiste nell'occludere selettivamente il ramo portale di destra o di sinistra, tramite iniezione percutanea selettiva di materiale occludente (Gelfoam, Lipiodol, etc). Tale procedura determina una atrofia del lobo omolaterale ed una ipertrofia del lobo controlaterale; questo porta ad un aumento del volume totale e, quindi,

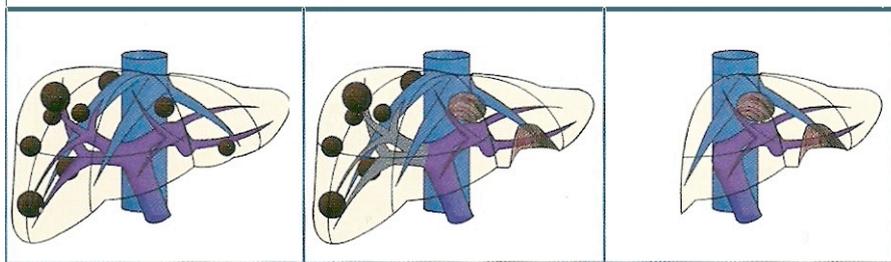
della riserva funzionale del fegato residuo, rendendo così possibili procedure resettive altrimenti non tollerabili per il paziente.

La chemioterapia neoadiuvante mira specificatamente ad ottenere un downsizing delle ripetizioni epatiche al fine di permetterne la resezione, piuttosto che all'eradicazione delle micrometastasi. Può essere somministrata per via sistemica o tramite infusione arteriosa epatica (HAI); tale procedura, dai risultati promettenti, consiste nell'infusione arteriosa selettiva intraepatica del farmaco chemioterapico, ed è per adesso utilizzata solo da centri altamente specializzati, in pazienti con malattia secondaria confinata al fegato che non presentano ittero o ascite. Secondo le linee-guida dell'NCCN<sup>41</sup>, un paziente sottoposto a chemioterapia per malattia metastatica epatica potenzialmente resecabile dovrebbe essere sottoposto ad una rivalutazione chirurgica due mesi dopo l'inizio del trattamento, e successivamente ogni due mesi, per verificare l'eventuale "conversione" allo status di malattia resecabile. Le frequenti rivalutazioni sono necessarie per non perdere la cosiddetta "finestra di opportunità", ovvero quello status ideale che si colloca tra i due estremi della progressione di malattia e della risposta radiologica completa (che comporta il rischio di effettuare una resezione non R0, dal momento che spesso, come dimostrato da studi

recenti, nei siti delle metastasi permangono foci microscopici di malattia neoplastica<sup>41</sup>). Le percentuali di “conversione” variano, nelle diverse casistiche, dal 3,3 al 40%. In particolare, nella vasta esperienza (oltre 1100 pazienti) dell’Hôpital Universitaire Paul – Brousse di Parigi<sup>46</sup>, i protocolli chemioterapici valutati hanno permesso di classificare come “good responders”, e quindi di portare ad una chirurgia resettiva “di salvataggio”, circa il 12,5% di pazienti con metastasi epatiche inizialmente non resecabili, con una overall survival a 5 anni del 33% ed una disease-free survival, sempre a 5 anni, del 22%.

Nel caso di metastasi inizialmente non resecabili, è anche possibile eseguire una cosiddetta “two-stage hepatectomy”<sup>21,39,47</sup>: la resezione a scopo curativo viene eseguita in due tempi, lasciando trascorrere fra un intervento e l’altro un congruo lasso di tempo atto a permettere la rigenerazione del parenchima epatico residuo. Insomma, la prima resezione ha lo scopo di rendere la seconda potenzialmente curativa. Nella prima procedura viene asportato il maggior quantitativo di tessuto tumorale possibile nel rispetto della funzionalità epatica residua, mentre nella seconda viene bonificato il restante parenchima epatico; è anche possibile bonificare per primo il lobo meno coinvolto (specie in caso di metastasi

sincrone), rinviando l'epatectomia maggiore al secondo tempo. Tra i due interventi viene generalmente somministrata una chemioterapia neoadiuvante, ed eventualmente viene eseguita l'embolizzazione portale.



Non esistono pareri concordi sulla gestione delle metastasi sincrone. Oggi, comunque, la maggior parte degli Autori ritiene che la resezione simultanea, laddove possibile, rappresenti la scelta terapeutica migliore. Restano ovviamente esclusi da tale approccio i pazienti sottoposti ad intervento chirurgico in urgenza per occlusione o perforazione, i pazienti con riserva epatica residua insufficiente (per estensione della malattia epatica o per patologia epatica sottostante), i pazienti anziani e/o con gravi comorbidità<sup>41,48,49</sup>.

Queste strategie si inseriscono, comunque, nel contesto di un management aggressivo delle lesioni secondarie, che comporta anche il ricorso ad eventuali ri-resezioni e/o resezioni di malattia extra-epatica. D'altra parte, il miglioramento delle terapie mediche, della tecnica chirurgica e delle terapie di supporto intensive perioperatorie ha permesso di ridurre drasticamente la mortalità post-operatoria, rendendo gli interventi di chirurgia resettiva sempre più diffusi. Va però sottolineato che, anche nel caso di resezioni epatiche effettuate con intento curativo, una vasta percentuale di pazienti (fino al 70%) sviluppa una recidiva locale o a distanza<sup>25,50</sup>; la recidiva si verifica in circa il 20% dei pazienti entro sei mesi dalla resezione, nell'80% dei pazienti entro due anni<sup>21</sup>. La sopravvivenza media dei pazienti con recidiva si aggira tra gli 8 e i 10 mesi in assenza di ulteriori trattamenti; tuttavia, in una percentuale di casi compresa tra il 10 e il 15% è possibile effettuare una nuova procedura resettiva, da sola o in associazione a metodiche ablativo, con un rischio operatorio maggiore ma con risultati comparabili con quelli della prima resezione. Una ri-resezione epatica può comportare, in pazienti selezionati, una sopravvivenza a cinque anni variabile tra il 15 ed il 52%<sup>21,38,39,46</sup>.

## LA NEOANGIOGENESI TUMORALE

La neoangiogenesi è il processo di formazione di nuovi vasi sanguigni; consiste nella creazione di nuovi vasi sanguigni a partire da quelli preesistenti, ed è il risultato dell'azione di vari fattori che, tramite specifici recettori, regolano l'attività delle cellule endoteliali, coinvolgendole, insieme alla matrice extracellulare, nella formazione dei nuovi vasi sanguigni<sup>51</sup>. Tale processo, caratterizzato da un equilibrio tra vasi formati e distrutti, è tipico di patologie infiammatorie, angioproliferative e neoplastiche<sup>51-53</sup>. Le cellule endoteliali, centrali nel fenomeno angiogenico, sono coinvolte, seguendo un programma geneticamente determinato, mediato da specifici fattori e recettori, in una serie di eventi quale proliferazione, differenziazione, migrazione ed organizzazione morfologica in stretta connessione con il tessuto circostante. Per rispondere al fabbisogno locale la rete viene rimodellata di continuo, sfrondando, allargando e creando nuovi rami della vascolarizzazione. A seconda del tipo di vaso, attorno alla struttura basale possono organizzarsi cellule di sostegno, cellule muscolari lisce e una matrice extracellulare. In questo

modo si realizza un sistema vascolare ordinato che in modo efficace rilascia ai tessuti sani le sostanze nutritive<sup>51</sup>.

L'angiogenesi è essenziale perché nell'embrione e nel bambino si realizzino una crescita e uno sviluppo normali, ma nell'adulto il suo ruolo fisiologico si limita alla cicatrizzazione delle ferite e al ciclo riproduttivo femminile<sup>51</sup>.

Il fattore fondamentale che regola il processo fisiologico di vasculogenesi e di angiogenesi è il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)<sup>54,55</sup>.

L'angiogenesi mediata dal VEGF rappresenta uno dei meccanismi principali attraverso il quale, nelle normali condizioni fisiologiche, avviene il controllo del livello di vascolarizzazione dei tessuti.

La famiglia del VEGF comprende diversi isotipi<sup>56,57</sup>: VEGF (o VEGF-A, o Vascular Permeability Factor), VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D. Esistono diverse isoforme di VEGF, rispettivamente di 206, 189, 165 e 121 amminoacidi. La specie molecolare predominante è VEGF165, che si presenta come una glicoproteina omodimerica basica che si lega all'eparina. Il VEGF svolge numerosi effetti biologici: una potente azione mitogenica sulle cellule endoteliali; un'azione sulla matrice extracellulare, in quanto stimola l'espressione di metallo-proteasi e la formazione di

fenestrazioni endoteliali; VEGF induce inoltre l'aumento della permeabilità vasale, provocando accumulo extravasale di fibrina, substrato per l'attività di cellule endoteliali e tumorali; per finire, interagisce con le cellule del sistema immunitario, tra cui le natural killer, inducendo l'espressione di molecole di adesione<sup>54</sup>.

Diversi meccanismi sono coinvolti nella regolazione del gene per VEGF. Un ruolo rilevante è giocato dalla tensione tissutale di O<sub>2</sub>, come dimostrato dall'aumento reversibile dei livelli di mRNA per VEGF in condizioni di ipossia in vivo e in vitro<sup>58,59</sup>. L'aumento dell'espressione di VEGF mRNA è mediato principalmente dal fattore di trascrizione HIF-1 (hipoxia-inducible factor 1), che si lega ad un sito di riconoscimento nella regione promotrice del gene del VEGF. L'aumento dei livelli di mRNA per VEGF in risposta all'ipossia è dovuto, oltre che all'incremento della trascrizione, ad una aumentata stabilità del messaggero tramite fissazione di una proteina indotta da ipossia ad una estremità non codificante del messaggero. E' stato riscontrato che il messaggero di VEGF è regolato a livello trascrizionale e post-trascrizionale anche da deficit di glucosio<sup>60</sup>.

Inoltre numerose citochine sono in grado di operare indirettamente un'up-regulation dell'mRNA di VEGF<sup>61,62</sup>.

Il VEGF umano si lega con alta affinità tre differenti recettori della famiglia delle tirosin-kinasi: VEGFR-1, un tempo noto come Flt-1 (fms-like tyrosine-kinase); VEGFR-2, prima conosciuto come Flk-1/KDR (Fetal Liver Kinase-1/Kinase insert Domain Receptor); e VEGFR-3, già noto come Flt-4<sup>63-68</sup>. Tutti i recettori consistono di 3 porzioni: una regione extracellulare formata da 7 domini, una regione transmembranale e una intracellulare responsabile dell'attività tirosin-kinasica (**Fig. 3**). I recettori possono anche esistere in forma solubile. Nell'adulto VEGFR-1 e VEGFR-2 sono espressi principalmente sulle cellule endoteliali vascolari, mentre l'espressione di VEGFR-3, che riconosce VEGF-C e VEGF\_D ma non VEGF-A, è per lo più limitata all'endotelio linfatico; VEGFR-2 è stato identificato, oltre che sulle cellule endoteliali, anche sui monociti e sulle cellule tumorali<sup>63</sup>. Gli effetti biologici del VEGF sono diversi in funzione del tipo di recettore con il quale interagisce: i recettori, benchè fortemente omologhi, attivano infatti vie di trasduzione distinte, trasmettendo segnali diversi alle cellule endoteliali<sup>63,65,69-71</sup>. Il VEGFR-2 sembra mediare quasi tutte le risposte cellulari conosciute del VEGF, compresa la proliferazione

delle cellule endoteliali. Il ruolo del VEGFR-1 è meno conosciuto, ma si pensa che possa agire come modulatore della trasmissione del segnale da parte di VEGFR-2: il VEGFR-1 potrebbe agire come “falso recettore”, sottraendo VEGF al legame con VEGFR-2. Nessun effetto mitogeno segue il binding di VEGF con VEGFR-1. L’ipossia e l’aumentata concentrazione locale di VEGF ad essa conseguente determinano una up-regulation dei recettori VEGFR-1 e VEGFR-2 sulle cellule endoteliali del tumore; VEGFR-3 appare invece essere up-regolato nell’angiogenesi tumorale in generale.

Analogamente a quanto avviene per le cellule normali, anche le cellule tumorali necessitano di una vascolarizzazione che garantisca una disponibilità di ossigeno e sostanze nutritive sufficienti a permettere la crescita e il mantenimento dei tessuti. È un processo importante nella crescita dei tumori maligni che, per svilupparsi oltre un diametro di 1-2 mm devono stabilire una propria rete vascolare per l’apporto di sangue. Il VEGF rappresenta uno dei principali regolatori dell’angiogenesi tumorale, ed è attualmente l’unico fattore angiogenico conosciuto ad essere presente durante l’intero corso della malattia tumorale<sup>72</sup>. La sua espressione

continua, insieme alla sua stabilità genetica e a quella delle cellule endoteliali, fanno dell'inibizione diretta e continua del VEGF un'importante strategia antitumorale.

### **L'angiogenesi tumorale**

Come già detto, analogamente a quanto avviene per i tessuti sani, anche per i tumori solidi l'accrescimento e la sopravvivenza dipendono dalla presenza di un'estesa rete di vasi sanguigni. Inoltre, la capacità del tumore di formare metastasi dipende in grande misura dallo sviluppo di una propria vascolarizzazione. L'angiogenesi patologica è quindi essenziale per la progressione maligna dei tumori solidi.

I tumori di piccole dimensioni, con un diametro inferiore ai 2 millimetri, sono quiescenti e si nutrono per semplice diffusione. Tuttavia, per il proprio sviluppo il tumore deve conquistare l'accesso alla vascolarizzazione dell'ospite e creare una propria vascolarizzazione. Per raggiungere questo obiettivo i tumori si sottopongono a un processo detto *switch angiogenico* (produzione di segnali che stimolano l'angiogenesi)<sup>52,53,73,74</sup>. Questo switch deriva dallo squilibrio tra i fattori

pro-angiogenici e quelli anti-angiogenici. Lo switch angiogenico che stimola l'angiogenesi tumorale è dovuto ad alterazioni dell'espressione, strettamente controllata, di questi fattori pro-angiogenici e anti-angiogenici; la vascolarizzazione tumorale che ne deriva è profondamente differente da quella dei tessuti sani e presenta importanti anomalie strutturali e funzionali<sup>74,75</sup>: i vasi mostrano, infatti, un profilo fortemente irregolare ed un decorso alquanto tortuoso; il diametro appare non uniforme, il calibro tendenzialmente superiore rispetto alle controparti normali; soprattutto, i vasi neoformati, a motivo delle anomalie morfologiche delle cellule endoteliali e della accentuata fenestrazione (aumentata distanza intercellulare, con conseguente formazione di falle nella parete vascolare), mostrano una elevata permeabilità ed una spiccata tendenza all'emorragia. La presenza di irregolarità nella vascolarizzazione tumorale fa sì che spesso l'apporto di sostanze nutritive alle cellule tumorali non sia ottimale. Nei vasi tumorali il flusso sanguigno è di solito incostante, viene rallentato dalla struttura caotica e può quindi indurre una disfunzione a livello capillare.

## **Funzione del VEGF nei tumori**

Come accennato sopra, nello sviluppo del tumore si distinguono due fasi: una fase avascolare, in cui le piccole lesioni (diametro < 2mm) appaiono quiescenti e si nutrono per semplice diffusione capillare, e una fase vascolare, nella quale una ulteriore crescita tumorale necessita della creazione di una idonea vascolarizzazione.

IL VEGF svolge un ruolo cruciale nella transizione dalla prima alla seconda fase (switch angiogenico), e, di conseguenza, nell'accrescimento della maggior parte dei tumori primari e nel successivo processo di metastasi<sup>76,77</sup> (**Fig. 4**). In molti tumori umani si osserva una sovraregolazione del VEGF e del suo mRNA (e dell'mRNA dei recettori del VEGF), con un aumento dei livelli di VEGF riscontrabile sia all'interno del tumore che in circolo. Come detto sopra, l'espressione di questa fondamentale molecola pro-angiogenica viene sovraregolata da molte condizioni caratteristiche dei tumori, quali l'ipossia, il rilascio di citochine, lo stress meccanico e la sovraregolazione degli oncogeni. La produzione di VEGF da parte del tumore crea un feedback positivo attraverso il quale l'angiogenesi indotta dal VEGF rende possibile un'ulteriore crescita

tumorale. Come risultato di questo rapido accrescimento il tumore supera i limiti della sua vascolarizzazione e l'apporto di ossigeno e delle sostanze nutritive diviene inadeguato, dando luogo ad aree di ipossia. L'ipossia stimola un'ulteriore produzione di VEGF, che a sua volta stimola la formazione di nuovi vasi. Una volta che il tumore è entrato nella fase vascolare, la formazione di nuovi vasi prosegue durante tutta la crescita tumorale.

Spesso i livelli più elevati di VEGF e di angiogenesi si trovano nelle zone adiacenti ai tessuti ischemici o necrotici dei tumori solidi. Tuttavia il VEGF è stato trovato in aree tumorali non ipossiche, a sostegno dell'ipotesi che la sua sovraespressione dipenda anche da altri meccanismi, quali l'attivazione degli oncogeni<sup>74,78</sup>.

IL VEGF agisce anche come fattore di permeabilità vascolare, grazie alla sua capacità di indurre la fenestrazione dei vasi e di aumentare la permeabilità del microcircolo<sup>63,79</sup>. L'aumento della permeabilità dei vasi sanguigni tumorali nei confronti delle macromolecole circolanti permette la fuoriuscita delle proteine plasmatiche (quali, ad esempio, il fibrinogeno e altre proteine della coagulazione), con la conseguente formazione di uno stroma pro-angiogenico. Un'ulteriore conseguenza dell'aumentata

permeabilità è l'innalzamento della pressione interstiziale, che inverte i gradienti di pressione normalmente presenti nel tessuto e in definitiva impedisce la penetrazione nei tessuti delle molecole, compresi gli agenti chemioterapici<sup>63</sup> (**Fig. 5**).

L'angiogenesi, stimolata dal VEGF, favorisce il contatto delle cellule tumorali con i vasi sanguigni, offrendo alle cellule una via per invadere i vasi stessi. I caratteri immaturi dei vasi sanguigni neoformati e la loro maggiore permeabilità faciliteranno l'invasione del circolo ematico da parte delle cellule tumorali e, quindi, il processo di metastatizzazione a distanza.

Il VEGF è coinvolto anche nella linfangiogenesi. Stimolando la formazione di vasi linfatici giganti, il VEGF fornisce un'altra possibile via di diffusione metastatica.

Il VEGF è il mediatore fondamentale dell'angiogenesi tumorale. Pertanto, con un'azione mirata di inibizione del VEGF si può prevedere di ottenere l'inibizione dell'angiogenesi, insieme ad altri effetti sulla vascolarizzazione tumorale, volti a inibire la crescita del tumore, senza compromettere la

funzione della normale vascolarizzazione nei tessuti sani. La traduzione del segnale da parte del VEGF può essere inibita agendo sia sul ligando che sul recettore. Tanto la molecola del VEGF quanto i suoi recettori costituiscono dei possibili bersagli promettenti per il trattamento antitumorale.

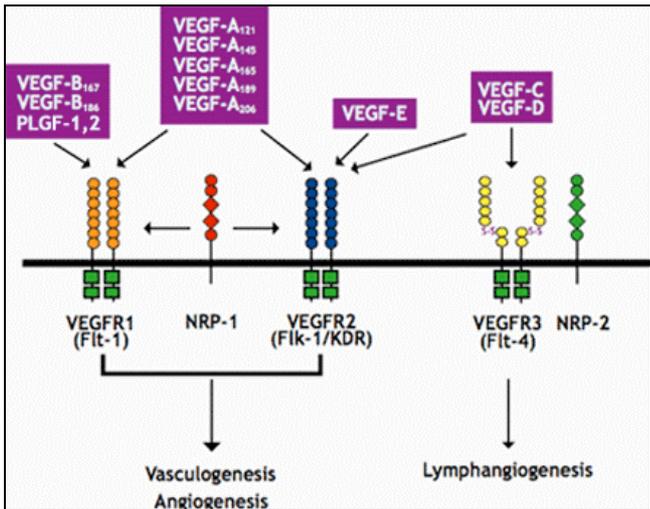


Fig. 3 – Recettori del VEGF

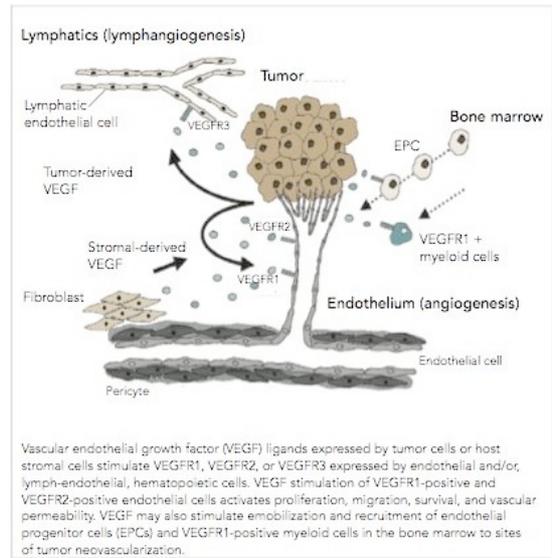


Fig. 4 – Il VEGF nella neoangiogenesi tumorale

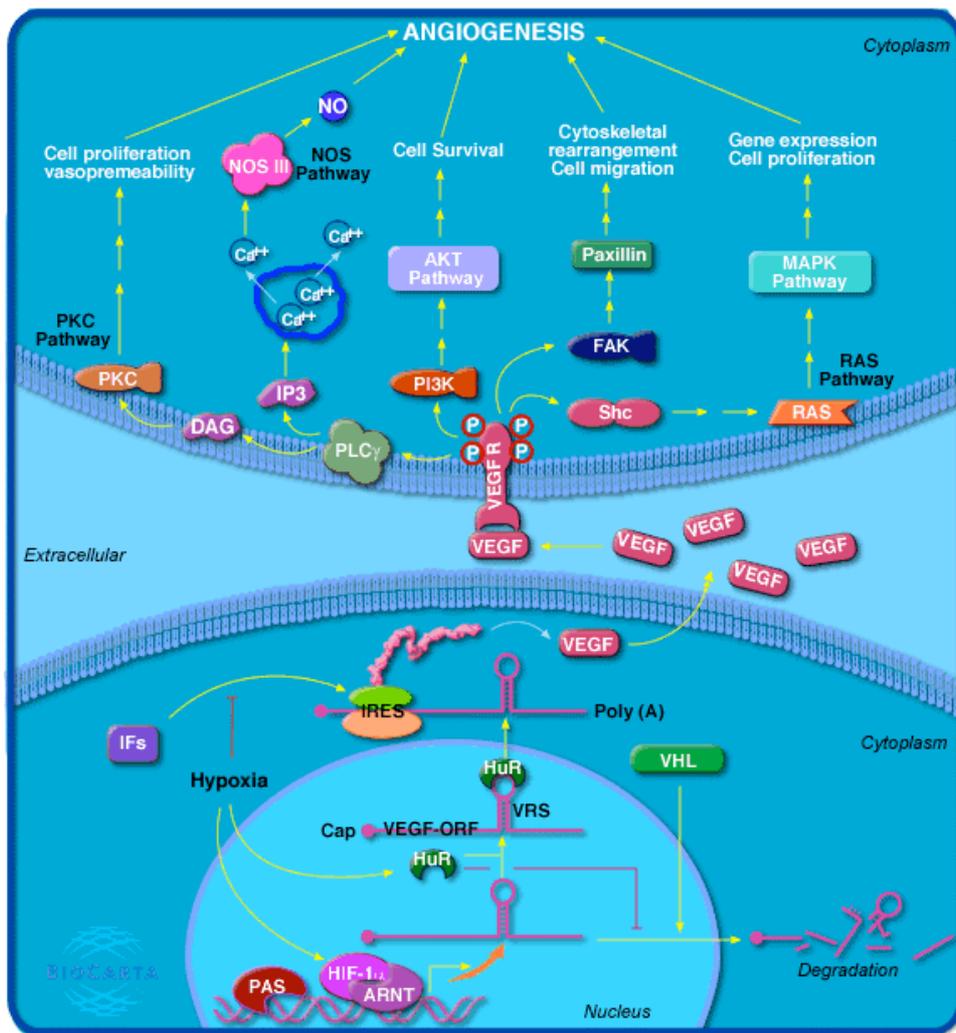


Fig. 5 – Meccanismi molecolari della neoangiogenesi

## **IL BEVACIZUMAB**

Il Bevacizumab è un anticorpo monoclonale (MAb, monoclonal antibody) umanizzato con una lunga emivita, sviluppato dal MAb murino anti-VEGF, A4.6.1, che inibisce in modo specifico il VEGF, bloccando in questo modo la cascata pro- angiogenica. Gli anticorpi anti-VEGF si legano al VEGF, eliminando la quota libera in circolo e impedendo che si leghi ai recettori. L'utilizzo degli anticorpi presenta diversi vantaggi: gli anticorpi, che sono stati appositamente disegnati, sono altamente specifici e si legano al solo VEGF, inibendone l'attività su tutti i recettori con i quali il ligando interagisce. La molecola riconosce tutte le principali isoforme di VEGF umano, ed esercita i suoi effetti antiangiogenici attraverso tre meccanismi chiave:

- La regressione della rete vascolare tumorale.
- La normalizzazione della rimanente rete vascolare.
- L'inibizione della neoformazione e della ricrescita dei vasi.

Il Bevacizumab può causare una regressione della rete vascolare del

tumore, consistente in una riduzione significativa del volume e della densità vascolare<sup>80,81</sup>: in seguito alla somministrazione di Bevacizumab si evidenzia, da un punto di vista anatomico-patologico, una riduzione della densità dei microvasi (MVD), che diventano più piccoli e meno tortuosi.

La riduzione della rete vascolare tumorale previene l'apporto di ossigeno e di sostanze nutritive al tumore, arrestando la sua crescita e inducendo potenzialmente una diminuzione delle sue dimensioni.

In termini di rilevanza clinica, la normalizzazione della rete vascolare tumorale può aumentare la captazione intratumorale della chemioterapia citotossica, suggerendo che l'uso più efficace degli agenti anti-VEGF è in associazione con i farmaci citotossici<sup>81-84</sup>.

La caratteristica assenza di controllo dell'angiogenesi tumorale produce una rete vascolare strutturalmente e funzionalmente alterata, caratterizzata da un aumento della densità, del diametro, della lunghezza e tortuosità dei vasi, da un aumento anormale della pressione interstiziale e da un aumento della permeabilità vascolare. Queste anomalie impediscono l'ingresso nell'ambito del tessuto neoplastico di molecole di grandi dimensioni, come i chemioterapici, la cui efficacia viene, quindi, notevolmente inficiata;

inoltre, l'ipossia che deriva da un irregolare apporto di ossigeno all'interno del tumore genera regioni resistenti alla radioterapia e ad alcuni agenti citotossici.

I farmaci antiangiogenici, come il Bevacizumab, normalizzano la rete vascolare tumorale, eliminando i vasi in eccesso, diminuendo la percentuale di vasi immaturi in favore di quella di vasi maturi e con un assetto funzionale più fisiologico, e riducendo la pressione del fluido interstiziale e la permeabilità vascolare<sup>81,85,86</sup>. Questo processo di sfrondamento e regressione dei vasi porta a una vascolarizzazione del tumore più ordinata, più fisiologica e più efficiente nel fornire sangue al tumore.

È stato ipotizzato che questi effetti possano rendere le cellule tumorali più sensibili alla chemioterapia citotossica, poiché viene aumentata la captazione intratumorale dei farmaci chemioterapici. Pertanto, la terapia a base di Bevacizumab in associazione alla chemioterapia potenzia l'efficacia della strategia antitumorale nel suo insieme, massimizzando l'efficacia di una terapia concomitante.

Il Bevacizumab, infine, può inibire continuamente la formazione di

nuovi vasi tumorali e la loro ricrescita<sup>87,88</sup>. La formazione di nuova rete vascolare è un evento fondamentale nel processo di crescita tumorale e per la disseminazione metastatica. Questa inibizione della neovascolarizzazione comporta, quindi, una diminuzione della crescita tumorale e del potenziale metastatico, rendendo possibile il controllo continuo della malattia: poiché le neoplasie non possono crescere oltre una certa dimensione senza l'angiogenesi, i tumori maligni possono rimanere una fase "dormiente" per lungo tempo, incapaci di invadere i tessuti circostanti.

Insomma, l'inibizione della neovascolarizzazione blocca la crescita delle cellule tumorali e previene le metastasi: negli studi clinici, la sopravvivenza dei pazienti risulta prolungata e la progressione della malattia ritardata. Il beneficio clinico sembra essere indipendente dalla risposta obiettiva del paziente alla terapia, valutata attraverso i criteri RECIST: in un'analisi retrospettiva dei dati di due studi di fase III in pazienti con carcinoma del colon-retto<sup>83,89,90</sup>, la risposta obiettiva non è stata predittiva dell'entità del beneficio (espresso in termini di PFS o OS) ottenuto con l'aggiunta di Bevacizumab alla chemioterapia; aumenti significativi e simili sia della PFS sia della OS sono stati registrati in pazienti con risposta

completa/parziale, malattia stabile o assenza di risposta.

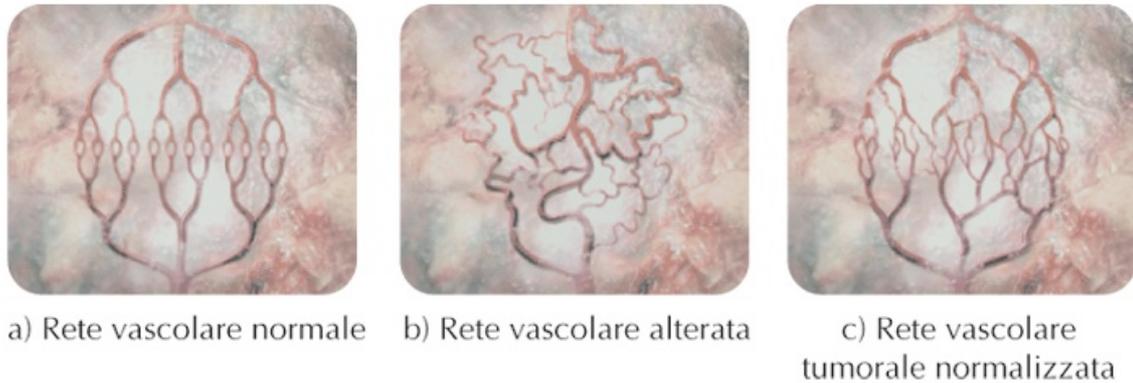


Fig. 6 – Cambiamenti nella rete vascolare tumorale nel corso di un trattamento antiangiogenico. Il **quadro a)** mostra una rete vascolare normale Il **quadro b)** mostra la rete vascolare alterata di un tumore (vasi immaturi caratterizzati da un aumento della permeabilità, del diametro, della lunghezza, della densità, della tortuosità dei vasi e della pressione del liquido interstiziale) Il **quadro c)** illustra come le terapie antiangiogeniche possano ridurre i vasi immaturi, normalizzando la rete vascolare tumorale.

Un ultimo aspetto degno di nota è la possibilità che il VEGF, oltre a indurre l'angiogenesi, possa favorire la crescita tumorale, prevenendo l'apoptosi delle cellule neoplastiche e configurandosi, quindi, come un fattore di sopravvivenza delle stesse. Diversi studi hanno dimostrato la presenza dei recettori del VEGF sulle cellule tumorali. Ciò suggerisce che le terapie anti-VEGF, eliminando la protezione indotta dal VEGF, possano incrementare l'apoptosi delle cellule tumorali<sup>91-94</sup>.

Il VEGF viene espresso nel corso dell'intero ciclo di crescita e sviluppo del

tumore: l'inibizione continua del VEGF con Bevacizumab fino alla progressione della malattia (PD) rappresenta pertanto un approccio razionale per inibire la crescita e la metastatizzazione del tumore. La continuazione di Bevacizumab fino a PD è di importanza fondamentale per massimizzare i benefici clinici. Sono attualmente in corso studi clinici controllati per testare l'ipotesi secondo la quale Bevacizumab potrebbe offrire ulteriori benefici, estendendo il trattamento oltre la PD.

Gli eventi avversi (AEs) degli agenti biologici sono strettamente dipendenti dal loro meccanismo d'azione e dalla loro specificità per il bersaglio. Per quanto concerne il Bevacizumab, i meccanismi alla base di tali AEs sono direttamente correlati all'inibizione mirata del VEGF. Il farmaco è, in genere, ben tollerato, ma può provocare alcuni eventi avversi tipici: gli AEs di particolare interesse includono sanguinamento, ritardo nella guarigione delle ferite, ipertensione, proteinuria, eventi tromboembolici, fistole e perforazioni gastrointestinali<sup>95-97</sup>. In generale, gli AEs attribuiti al Bevacizumab si manifestano con bassa frequenza o sono di entità da lieve a moderata e clinicamente gestibili con un approccio terapeutico convenzionale.

Diversi studi hanno dimostrato come l'aggiunta di Bevacizumab alla chemioterapia sia in grado di determinare un prolungamento significativo della sopravvivenza globale e libera da malattia nel cancro del retto metastatico; tali studi, tra cui vanno citati l'ECOG 3200<sup>84</sup>, il No16966<sup>98</sup> ed il BICC-C<sup>99</sup>, hanno valutato l'aggiunta di Bevacizumab a regimi chemioterapici tanto di prima che di seconda linea.

## **CRITERI RECIST**

I criteri RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) consistono in un insieme di parametri che permettono di valutare la risposta obiettiva dei tumori solidi alla terapia specifica. Pubblicati nel 2000 da una collaborazione internazionale tra l'EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer), il NCI degli Stati Uniti ed il National Cancer Institute del Canada, ed aggiornati alla versione 1.1 nel 2009 (vedi Tabella 1), i criteri RECIST sono oggi quasi universalmente utilizzati nei trials clinici per valutare in maniera standardizzata la risposta obiettiva delle neoplasie solide al trattamento<sup>100</sup>.

Le metodiche diagnostiche più comunemente utilizzate, per la loro efficacia e riproducibilità, nella valutazione delle lesioni target (ovvero quelle lesioni selezionate per la valutazione della risposta alla terapia) sono la TC e la RM. In alcune circostanze è possibile avvalersi anche di Rx torace, ecografia senza e con mezzo di contrasto, endoscopia e laparoscopia.

Per l'applicazione dei criteri RECIST la patologia neoplastica dovrebbe essere presente e misurabile alla valutazione basale (baseline). Questa va

effettuata prima dell'inizio del regime terapeutico di scelta ed il più possibile a ridosso di esso; le valutazioni successive vengono effettuate ad intervalli variabili in base al tipo di studio designato, con la stessa tecnica e lo stesso metodo di valutazione. Si definisce “malattia misurabile” la presenza di almeno una lesione misurabile, intesa come una lesione che può essere accuratamente misurata in almeno una dimensione, con un diametro maggiore di almeno 2 cm per le tecniche tradizionali e di almeno 1 cm per la TC spirale. Tutte le altre lesioni (diametro maggiore inferiore ai 2 cm per le tecniche tradizionali e 1 cm per la TC spirale, lesioni ossee, ascite...) vengono definite “non misurabili”.

Tutte le lesioni misurabili, fino a un massimo di due lesioni per organo e cinque lesioni in totale, rappresentative di tutti gli organi coinvolti, dovrebbero essere identificate come lesioni target, registrate e misurate al baseline. Le lesioni target dovrebbero essere selezionate in base alle dimensioni (vanno scelte quelle con il diametro maggiore) ed alla possibilità di sottoporle ad accurate misurazioni ripetute. La somma dei diametri maggiori (sum of longest diameter, o SLD) di tutte le lesioni target viene riportata come baseline SLD e utilizzata come termine di paragone

nelle valutazioni successive. Tutte le altre lesioni “non-target” vanno identificate e monitorizzate, anche se la loro misurazione non è richiesta.

In base alla risposta delle lesioni target si individuano le seguenti categorie:

- Complete Response (CR): scomparsa di tutte le lesioni target;
- Partial Response (PR): diminuzione della somma dei diametri maggiori di almeno il 30%;
- Progressive Disease (PD): incremento di almeno il 20% nella somma dei diametri maggiori (prendendo come riferimento la più piccola SLD registrata dall’inizio del trattamento o la comparsa di una o più nuove lesioni);
- Stable Disease (SD): assenza di incrementi o decrementi sufficienti per classificare la risposta come PR o PD (prendendo come riferimento la più piccola SLD registrata dall’inizio del trattamento)

Le lesioni non-target vengono, invece, classificate come segue:

- Complete Response (CR): scomparsa di tutte le lesioni non-target e normalizzazione dei valori dei markers tumorali;

- Incomplete Response / Stable Disease (SD): persistenza di una o più lesioni non-target e/o alterazione persistente dei valori dei markers tumorali;
- Progressive Disease (PD): comparsa di una o più nuove lesioni e/o progressione certa di lesioni non-target preesistenti.

Si definisce “best overall response” la miglior risposta registrata dall’inizio del trattamento fino alla progressione o alla recidiva di malattia. I pazienti con scadimento delle condizioni generali tale da richiedere la sospensione del trattamento, in assenza di progressione di malattia obiettiva bile, dovrebbero essere classificati come “pazienti con deterioramento sintomatico”.

Un aspetto da sottolineare in merito ai criteri RECIST è che essi si basano su una valutazione puramente morfologica e quantitativa, in assenza di qualsiasi valutazione funzionale: i parametri presi in considerazione sono, difatti, la dimensione delle lesioni in esame e la sua variazione nel tempo, mentre non vengono esaminate la vitalità del tessuto neoplastico residuo e l’eventuale necrosi tumorale. Questo potrebbe portare a classificare come

SD delle lesioni potenzialmente valutabili come PR. Proprio in virtù di queste considerazioni, uno studio funzionale del tessuto neoplastico tramite tecniche di imaging perfusionale potrebbe validamente integrare la valutazione RECIST della risposta alla terapia, fornendo ai clinici informazioni determinanti per la pianificazione della successiva strategia terapeutica.

|   | <b>RECIST</b>                                       | <b>RECIST 1.1</b>   |
|---|---|---|
| <b>Measurable Disease at BL</b>             | Required, MTLs                                      | When required then MTLs, Pats. with non-measurable disease only are allowed |
| <b>Minimum Target Lesion Size</b>           | ≥10 mm (Spiral CT)<br>≥20 mm (Conventional CT, MRI) | ≥10 mm (CT + MRI)<br>≥15 mm Lymph nodes<br>≥20 mm Chest X-Ray               |
| <b>No. of measurable Lesions, per organ</b> | 1-10<br>5   | 1-5<br>2  |
| <b>Measurement</b>                          | Uni-Dimensional                                     | Uni-Dimensional<br>Lymph nodes = short axis                                 |
| <b>PD</b>                                   | 20% increase in SLD from Nadir                      | 20% increase in SOD<br>+ min. 5mm increase from Nadir                       |
| <b>Confirmation of CR and PR</b>            | After at least 28 days                              | Only required, if response is primary endpoint and not randomized           |
| <b>Non Measurable Assessment</b>            | Unequivocal progression                             | ... substantial worsening,<br>... tumor burden has increased sufficiently   |
| <b>Lymph node Measurements</b>              | None  | Specific instructions<br>≥15mm, 10-14mm, <10mm                              |
| <b>PET</b>                                  | Not available                                       | May be considered to support CT; for PD and confirmation of CR              |

Tabella 1 – Sintesi comparativa dei criteri RECIST e RECIST 1.1

## LO STUDIO PERFUSIONALE TC

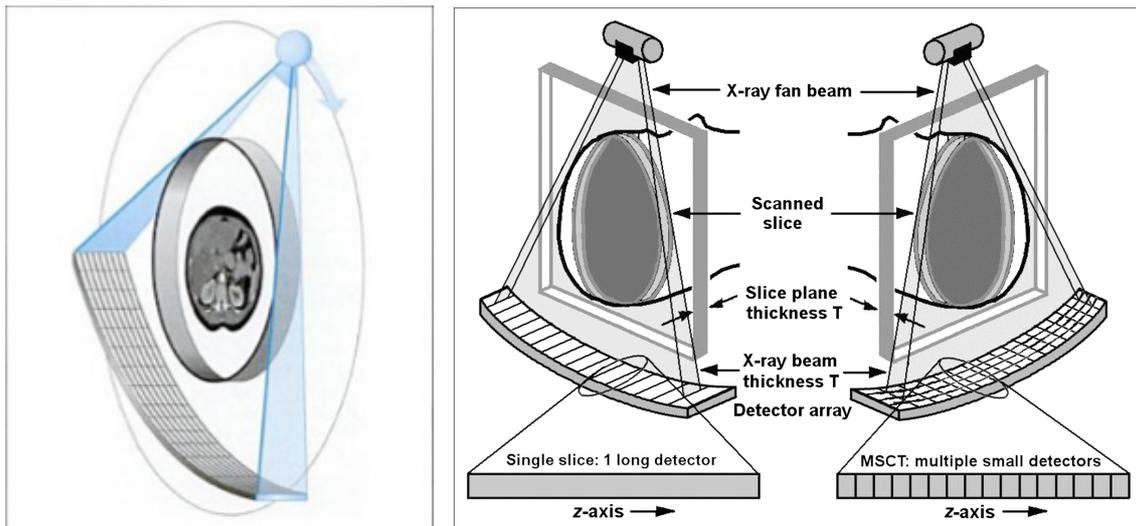
L'immagine TC viene costruita misurando l'attenuazione di un fascio collimato di raggi X generati da un tubo radiogeno rotante attorno al paziente, posizionato su un lettino che si muove in direzione longitudinale. Ogni immagine rappresenta l'attenuazione del fascio a raggi X da parte dei tessuti contenuti in ciascuna sezione corporea irradiata; l'attenuazione è proporzionale al numero atomico ( $Z$ ). L'intensità dei raggi X che hanno attraversato i tessuti in esame viene registrata da un array di rivelatori (detettori) in posizione opposta rispetto al tubo radiogeno ed accoppiati a convertitori analogico-digitali; quindi, per ciascuna sezione irradiata, il segnale digitalizzato relativo a diversi angoli di rotazione del complesso tubo – detettore (proiezioni) viene integrato ed elaborato in modo da ottenere un'immagine in cui le differenze di contrasto fra i vari punti che la compongono corrispondono a differenze di attenuazione fotonica fra tessuti e/o materiali diversi. L'immagine TC è, in ultima analisi, un'immagine monoparametrica rappresentativa della distribuzione spaziale della densità elettronica dei tessuti compresi nello strato corporeo in esame. Per convenzione, in essa un voxel (un'area tridimensionale rappresentata

geometricamente da un parallelepipedo, la cui base dipende dalla matrice di acquisizione, e la cui altezza corrisponde allo spessore dello strato) con maggiore densità verrà rappresentato, nel pixel che gli corrisponde, con una gradazione di grigio più chiara rispetto ad un voxel con minore densità: il rapporto tra densità elettronica, valore densitometrico e gradazione di grigio dell'immagine è quindi unidirezionale.

Gli apparecchi TC spirali monodetettore compiono un'intera rotazione del complesso tubo-detettori in 0.7 secondi - 1 secondo e consentono l'acquisizione continua per un massimo di 50-60 secondi, rendendo possibile la scansione di volumi corporei relativamente ampi in un'unica apnea. Oggi, però, questi apparecchi sono ampiamente superati dagli apparecchi TC multidetettore (o multistrato: TCMS), nei quali i raggi X attenuati dal paziente vengono rilevati da filiere multiple di detettori affiancati lungo l'asse longitudinale, che inviano il loro segnale ad una serie di convertitori analogico-digitali (da 4 a 64 ed oltre). A seconda del numero, delle dimensioni e della configurazione dei detettori, è possibile ottenere spessori di strato differenti con collimazioni del fascio radiante più ampie rispetto alla tecnologia spirale monodetettore, riducendo i tempi di acquisizione e/o consentendo l'acquisizione di immagini con risoluzione

spaziale longitudinale addirittura submillimetrica (grazie allo spessore assai ridotto dei singoli detettori rispetto alla tecnologia spirale monodettore). Inoltre, la possibilità di mediare il segnale proveniente da più detettori, la modificazione delle dimensioni del gantry (che permette di sopportare forze centrifughe maggiori, consentendo tempi di rotazione di 500ms o inferiori) e la maggiore capacità termica e di corrente dei tubi radiogeni contribuiscono a ridurre drasticamente i tempi di acquisizione e la quantità di mezzo di contrasto endovenoso necessaria per un buon enhancement contrastografico (soprattutto negli studi angio-TC e nelle fasi arteriose parenchimali per la valutazione di tessuti ipervascolari), preservando un rapporto segnale-rumore adeguato. L'elevata risoluzione spaziale lungo l'asse longitudinale consente, poi, di ottenere voxel isotropici, ovvero di dimensioni uguali su tutti e tre gli assi spaziali; questo permette di disporre le immagini in piani di imaging orientati arbitrariamente. Ciò è particolarmente importante ai fini di massimizzare la qualità delle ricostruzioni multiplanari e volumetriche, comportando un potenziale aumento dell'accuratezza diagnostica soprattutto nella valutazione di piccole lesioni (in particolare se con risoluzione di contrasto relativamente bassa rispetto ai tessuti circostanti) e nella stadiazione chirurgica. Tali

caratteristiche risultano particolarmente importanti nello studio dei pazienti oncologici, anche per quanto riguarda la patologia focale epatica.



La TC Perfusione è una metodica di imaging funzionale che caratterizza lo stato di perfusione di un tessuto in base alla variazione della densità di questo indotta dal passaggio di un bolo di MdC: il bolo di contrasto determina un aumento transitorio della densità del tessuto che è proporzionale alla quantità di MdC presente, a sua volta dipendente dallo stato di perfusione della zona esaminata. Poiché nelle lesioni neoplastiche si verifica un aumento della perfusione a causa dei fenomeni di neovascolarizzazione, i parametri di perfusione costituiscono indicatori

della angiogenesi tumorale. Pertanto la TC perfusionale nello studio della patologia neoplastica può permettere di ottenere una migliore caratterizzazione della lesione e di valutarne il comportamento e, soprattutto, la risposta alla terapia<sup>101-104</sup>.

Questa tecnica fu inizialmente introdotta per la quantificazione della perfusione ematica cerebrale nei pazienti con ictus cerebrale ischemico acuto<sup>105</sup>, ed è stata recentemente riscoperta come un promettente strumento non invasivo per la valutazione delle alterazioni del microcircolo in numerose neoplasie, come l'epatocarcinoma, le lesioni epatiche secondarie, i carcinomi del pancreas, del polmone, del retto e del distretto testa-collo<sup>106,107</sup>. Il rinnovato interesse nelle applicazioni oncologiche della TC di perfusione è stato alimentato dalla disponibilità di apparecchiature TCMS più veloci e con un elevato numero di file di detettori (16-64 strati e oltre), che permettono di ottenere una risoluzione spaziale longitudinale migliore ed una copertura anatomica a tavolo fermo maggiore rispetto alle precedenti generazioni di scanner TC; questo comporta la possibilità di ottenere una valutazione volumetrica affidabile dei parametri perfusionali nell'ambito di vaste aree del torace o dell'addome, permettendo addirittura di effettuare un esame "d'organo", piuttosto che "di sezione" (cioè limitato

ad alcune sezioni dell'organo in esame), come accadeva fino a poco tempo fa<sup>101,102,108</sup>. Inoltre, dall'utilizzo di queste apparecchiature di ultima generazione si possono trarre altri importanti vantaggi, prima fra tutti una minore sensibilità dell'acquisizione ad artefatti da movimento, che possono comportare fenomeni di disallineamento degli strati (soprattutto nella fase finale della serie temporale acquisita) ed impedire un corretto calcolo dei valori perfusionali<sup>102,108</sup>.

Lo studio perfusionale si basa sulla registrazione continua dell'attenuazione dei raggi X da parte di un piccolo e rapido bolo di mdc iodato su una determinata regione di interesse (Region of Interest, ROI). L'acquisizione dinamica dura per un tempo necessario a coprire la fase di primo passaggio (first pass) del mdc organo-iodato all'interno del letto vascolare regionale, durante la quale esso ha una distribuzione intravascolare<sup>103,109-111</sup>.

Il principio chiave delle classiche tecniche TC di perfusione consiste nell'assunto che lo spazio vascolare del tessuto esaminato sia comparabile, da un punto di vista emodinamico, ad un compartimento singolo dotato di un ingresso ed un'uscita (modello unicompartimentale), che corrispondono rispettivamente alle arterie afferenti e alle vene efferenti (le quali drenano l'intera quantità di sangue proveniente dall'ingresso arterioso)<sup>103,110</sup>. In altri

termini, il modello unicompartimentale è applicabile se si può assumere che la dispersione interstiziale del mdc sia trascurabile durante il first pass. Se la dispersione interstiziale del mdc non è trascurabile (come negli studi TC di perfusione in campo oncologico, in cui si prevede che il mdc fuoriesca durante il first pass attraverso i vasi altamente permeabili del microcircolo neoangiogenico), è necessario ricorrere ad un modello bicompartimentale, che tenga conto del fatto che la quantità di sangue proveniente dall'ingresso arterioso viene trasferita in parte all'uscita venosa ed in parte al compartimento interstiziale<sup>103,110</sup>. Affinché l'applicazione del modello bicompartimentale possa fornire risultati adeguati, è necessario che l'acquisizione dei dati TC venga prolungata oltre la durata del first pass, in modo da comprendere almeno la parte iniziale del passaggio interstiziale del mdc per il calcolo della permeabilità vascolare.

Lo studio perfusionale viene effettuato seguendo una serie di passaggi ben definiti<sup>103,109,112</sup>: dopo l'acquisizione di un volume senza mdc (spessore di strato 10 mm), si effettua l'iniezione di mdc a bolo. Si esegue quindi una acquisizione dinamica: l'acquisizione delle immagini avviene in maniera continua (modalità cine) sulle ROI selezionate; queste vengono disegnate a mano nel contesto delle lesioni in esame, in corrispondenza del deposito

intralesionale di mezzo di contrasto, e nel parenchima epatico normale circostante. Infine, si passa all'elaborazione dei dati alla work-station, con conseguente creazione di vere e proprie mappe funzionali delle regioni esaminate.

I parametri generalmente presi in esame nel corso di una TC perfusionale sono i seguenti:

- **Flusso ematico (BF, Blood Flow)**: è definito come il flusso di sangue all'interno dei vasi di un tessuto (ml/100g/min).
- **Volume ematico (BV, Blood Volume)**: misura il volume di sangue per unità di massa (ml/100g).
- **Perfusione arteriosa (Arterial Perfusion, AP)**: è il flusso ematico arterioso (ml/min).
- **Indice di perfusione arterioso epatico (HAPI, Hepatic Arterial Perfusion Index)**: rappresenta la percentuale di origine arteriosa del flusso sanguigno epatico globale (%).
- **Tempo di picco (Time To Peak, TPP)**: rappresenta il tempo necessario per raggiungere la massima concentrazione del mezzo di contrasto.
- **Tempo medio di transito (MTT, Mean Transit Time)**: è il tempo tra

afflusso arterioso ed efflusso venoso (sec).

- **Superficie di permeabilità capillare (PMB o CP, Capillary Permeability):** è il prodotto della permeabilità capillare e dell'area della superficie totale dei capillari perfusi per unità di massa (ml/100g/min).

La neoangiogenesi tumorale dà solitamente luogo al riscontro di elevati valori del BV e soprattutto del BF; l'aumento del BF a sua volta spiega la frequente riduzione del MTT, essendo infatti:  $MTT = BV/BF$ . L'aumento della CP è dovuto sia all'aumentato volume ematico sia all'alterata permeabilità capillare per la presenza di capillari malformati nel letto tumorale.

La TC perfusionale è una metodica non invasiva, e come tale può essere ripetuta in maniera sequenziale per valutare i cambiamenti nel flusso ematico tumorale; ciò riveste grande importanza nel monitoraggio della risposta ai farmaci antiangiogenici e alle altre terapie. L'utilità della caratterizzazione della perfusione epatica risiede anche nella possibilità di valutare ciascuna delle due componenti dell'apporto ematico (arteriosa e portale), dal momento che le relative percentuali risultano alterate in maniera prevedibile in diversi tipi di tumore e potrebbero essere utili nel

valutare l'efficacia del trattamento<sup>113</sup>. Le variazioni nei sopra citati parametri perfusionali potrebbero, infatti, permettere di individuare precocemente i pazienti che rispondono bene alla terapia con farmaci antiangiogenici, stratificando così i soggetti sottoposti a tali trattamenti in due categorie, quella dei responders e quella dei non-responders, e adattando di conseguenza il regime terapeutico di scelta alle esigenze del singolo individuo. Inoltre, la valutazione perfusionale del fegato metastatico può fornire uno studio molto accurato delle lesioni secondarie dal punto di vista anatomico, il che può rivelarsi di grande utilità nella pianificazione di un'eventuale terapia chirurgica e/o ablativa<sup>113-116</sup>.

Il limite maggiore della metodica rimane, a tutt'oggi, l'elevata dose di radiazioni somministrata al paziente nel corso di un'indagine perfusionale, molto maggiore rispetto a quella somministrata nel corso di un esame TC convenzionale<sup>101,109</sup>; diverse strategie sono state proposte per ridurre l'esposizione, ma nessuna di queste è stata ancora validata da una sufficiente produzione scientifica. È stato, tuttavia, sottolineato che, se l'esposizione radiologica della TC perfusionale viene considerata accettabile in pazienti precedentemente sottoposti a terapia radiante, a maggior ragione dovrebbe esserlo per i pazienti affetti da cancro coloretale

e metastasi epatiche, che generalmente non vengono sottoposti a radioterapia se non in casi selezionati (downstaging preoperatorio di tumori del retto basso, trattamento palliativo di tumori del retto localmente avanzati)<sup>101</sup>.

Un altro aspetto da tenere presente è che, nella maggior parte degli studi, la valutazione anatomico-funzionale ottenuta tramite TC perfusionale non viene validata da una successiva analisi istopatologica della neoplasia in oggetto. Bisogna, comunque, sottolineare che i parametri funzionali ottenuti tramite uno studio perfusionale riflettono in maniera più realistica e diretta, rispetto al parametro istopatologico della densità microvascolare (MVD), il reale apporto ematico del tumore, e potrebbero, quindi, permettere una valutazione più efficace della risposta alla terapia antiangiogenica<sup>117</sup>. A tal proposito, è interessante citare il lavoro sperimentale di Kan et al su modello murino<sup>112</sup>, che ha dimostrato come i valori perfusionali rilevati alla TC, in quanto, per l'appunto, parametri funzionali, non riflettano i reali cambiamenti della MVD del tumore: la TC perfusionale, infatti, è in grado di rilevare soltanto quei vasi all'interno dei quali vi sia un flusso ematico; pertanto, non è in grado di evidenziare vasi oblitterati, vasi immaturi e singole cellule endoteliali anomale.

## **LA CEUS (CONTRAST-ENHANCED ULTRASONOGRAPHY)**

L'introduzione dei mezzi di contrasto ecografici nella pratica clinica, a partire dalla metà degli anni '90, ha dato un ulteriore impulso all'ultrasonografia come metodica diagnostica e stadiativa.

Diversi sono gli ambiti clinici interessati da questa rivoluzione; tra questi, però, lo studio delle lesioni nodulari epatiche rappresenta senza dubbio una delle applicazioni in cui l'uso dei mezzi di contrasto ha maggiormente implementato il ruolo giocato dalla metodica ecografica<sup>118</sup>. L'utilizzo dei suddetti MdC permette, infatti, una migliore e più efficace valutazione delle lesioni epatiche, consentendone un'accurata definizione ed una valida diagnostica differenziale, e permettendo un follow-up efficace tanto delle lesioni benigne o di dubbio significato, quanto delle lesioni maligne sottoposte a terapia specifica.

Come attestato da numerosi lavori scientifici, e come confermano anche le recenti linee-guida della European Federation of Societies for Ultrasound in Medicine and Biology (EFSUMB), la sensibilità della CEUS nell'individuazione e caratterizzazione delle lesioni focali epatiche, in particolare di quelle secondarie, è in grado di raggiungere percentuali molto

elevate, superiori al 90% in alcune casistiche, e paragonabili a quelle ottenute dalla TC convenzionale con mezzo di contrasto, sebbene inferiore a quelle ottenute con una TC multistrato di ultima generazione<sup>119,120</sup>. La natura “real-time” delle acquisizioni delle immagini rappresenta un grosso vantaggio, perché permette una caratterizzazione del flusso ematico molto importante ai fini della diagnostica; stante la persistenza delle microbolle nella fase tardiva, le caratteristiche rilevate riguardano non solo l’apporto ematico arterioso e portale delle lesioni, ma anche il deflusso venoso (il che consente, quindi, una valutazione dello spazio sinusoidale)<sup>119</sup>. La fase arteriosa fornisce informazioni sul grado e sul pattern di vascolarizzazione della lesione in esame, mentre le fasi portale e tardiva indagano il “wash-out” del mezzo di contrasto dalla lesione e la differenza rispetto a quello del tessuto epatico sano circostante<sup>119,121</sup>.

La maggior parte delle lesioni maligne si presenta ipoecogena nelle ultime due fasi, contrariamente alle lesioni benigne che, generalmente, appaiono iso- o iperecogene<sup>117-121</sup>. Le metastasi, nello specifico, possiedono un apporto ematico prevalentemente arterioso, con grado variabile in base alla loro origine; pertanto possono presentare un enhancement diffuso e/o disomogeneo (metastasi ipervascolari) oppure meno marcato e periferico

(“rim enhancement”; metastasi ipovascolari). In entrambi i casi, comunque, è costante la ipoecogenicità nelle fasi portale e tardiva, che contrasta con la persistenza dell’enhancement nel parenchima circostante; questo rapido wash-out si spiega da un lato con l’assenza di apporto ematico portale, e dall’altro con un apporto ematico frazionato molto minore rispetto al tessuto epatico normale<sup>119</sup>.

I Mdc utilizzati sono costituiti da soluzioni o sospensioni contenenti, nel loro contesto, microbolle gassose, stabilizzate da membrane di diversa natura, e con diametro medio inferiore a quello di un globulo rosso ( $< 7 \mu\text{m}$ )<sup>118</sup>. Queste, iniettate nel circolo ematico, mimano il comportamento dei globuli rossi e si localizzano all’interno dei vasi (“blood pool”) senza entrare nell’interstizio. Queste sostanze, altresì definite “Mdc intravascolari”, vengono successivamente eliminate per via respiratoria.

L’interfaccia gas-sangue di ciascuna microbolla agisce da riflettore del fascio ultrasonoro incidente, amplificando in maniera significativa il segnale di ritorno alla sonda, e quindi l’ecogenicità del sangue e dei vasi in cui essa circola. Una volta somministrate per via endovenosa, le microbolle sono rapidamente solubilizzate nel sangue, e la sopravvivenza all’interno di

quest'ultimo è legata al raggio della microbolla stessa, direttamente proporzionale alla tensione superficiale, che ne limita la permanenza intravascolare a circa 0,25 secondi. Poiché occorrono dai 10 ai 30 secondi perché il contrasto raggiunga l'organo da studiare ed è necessario disporre di un tempo sufficiente per eseguire le valutazioni diagnostiche, la durata ottimale di un mezzo di contrasto dovrebbe essere nell'ordine di alcuni minuti. Pertanto, per prolungarne l'emivita così da ottenere un esame adeguato dal punto di vista diagnostico, le microbolle vengono "incapsulate" in una membrana stabilizzante contenente materiali organici e tale da permetterne la diffusione nel sangue (fosfolipidi, albumina...) <sup>118</sup>.

In base alle caratteristiche fisiche si distinguono MdC di prima e di seconda generazione <sup>118</sup>. I primi, costituiti da microbolle contenenti aria, hanno mostrato un'eccessiva variabilità per intensità e durata, e sono pertanto caduti in disuso. I MdC di seconda generazione contengono invece gas inerti, scarsamente solubili nel sangue e stabilizzati; ad esempio il Sonovue® (Bracco) è costituito da microbolle contenenti esofluoruro di zolfo e stabilizzate da fosfolipidi.

Lo sviluppo di tecnologie ultrasonografiche cosiddette “armoniche”, o non lineari, ha permesso di massimizzare l’efficacia dei MdC. L’imaging armonico è basato sulla rilevazione di un segnale prodotto dal MdC che ha una frequenza doppia rispetto alla frequenza trasmessa e a quella proveniente dal tessuto circostante, che non contiene MdC o ne contiene poco. L’intensità del segnale armonico dipende dalle caratteristiche del MdC e dalla pressione acustica e dalla frequenza del fascio insonante. Pertanto, il vantaggio principale di queste tecniche contrasto-specifiche è quello di riuscire a rilevare il segnale proveniente dalle microbolle (anche quelle ferme o a lento movimento) e, contemporaneamente, di sopprimere gli echi provenienti da strutture o tessuti non contenenti microbolle. Di conseguenza, esse amplificano il segnale del MdC, ad esempio, presente nei vasi precapillari e capillari normali e del microcircolo tumorale.

Fondamentalmente due sono le modalità con le quali è possibile rilevare un segnale non lineare dalle microbolle: imaging intermittente ed imaging in tempo reale. L’imaging intermittente, impiegando elevate pressioni acustiche, induce la rottura delle microbolle e, conseguentemente, produce un segnale ad elevata ampiezza, ma transitorio. Tale tecnica veniva utilizzata con i MdC di I generazione, che mostravano una bassa resistenza

alla pressione acustica. L'imaging in tempo reale utilizza basse pressioni acustiche, per cui il segnale viene prodotto dalla oscillazione e non dalla rottura delle microbolle, che anzi viene minimizzata. Tale segnale è meno ampio ma più persistente, ed è efficacemente prodotto dai MdC di II generazione. Questa tecnica di scansione continua in real-time a basso indice meccanico, conosciuta come Contrast Tuned Imaging (CnTI), sopprime più efficacemente il segnale non lineare proveniente dai tessuti. Il vantaggio di questa tecnologia consiste nella possibilità di filtrare gli echi in maniera mirata e, quindi, rimuovere qualsiasi segnale non utile alla diagnosi, senza distruggere le microbolle; ciò avviene grazie alla regolazione automatica selettiva dell'eco sul mezzo di contrasto ed al mantenimento di una pressione acustica ridotta e costante durante tutto l'esame, il che aumenta notevolmente la vita delle microbolle nel circolo ematico<sup>118,119</sup>.

Da un punto di vista metodologico, la CEUS eseguita per caratterizzare una lesione focale epatica o per valutarne la risposta al trattamento deve prevedere una serie di passaggi metodologici. Innanzitutto, non si può prescindere da un'iniziale valutazione del fegato con ecografia

convenzionale associata a Color-Power Doppler. Una volta identificata la lesione o le lesioni “target”, si posiziona la sonda sull’immagine individuata e si riduce l’indice meccanico (e quindi la pressione acustica) del fascio ultrasonoro, così da ottenere una sufficiente cancellazione del segnale proveniente dai tessuti. Quindi, si somministra un bolo di MdC ev, seguito da un bolo di soluzione salina; le linee-guida raccomandano di utilizzare un’agocannula di almeno 20 Gauge, per evitare la rottura meccanica delle bolle. Si effettuano scansioni continue, in modo da valutare il comportamento dinamico della lesione nelle varie fasi di enhancement vascolare: la fase arteriosa (con inizio a 10 – 20 secondi e termine a 25 – 35 secondi), la fase portale (tra i 30 – 45 secondi e i 120 secondi dall’iniezione) e la fase tardiva (dai 120 secondi circa fino alla scomparsa delle bolle, dopo 240 – 360 secondi). In genere, trascorsi circa 90 secondi dal bolo, è opportuno interrompere l’esame per qualche secondo, per non provocare una eccessiva rottura delle microbolle (comunque presente, seppur in minima parte). L’esame viene ovviamente documentato con video o filmati digitali.

I MdC ecografici possono essere somministrati in pressoché tutti i pazienti, comprese le donne gravide o in allattamento. Le principali

controindicazioni al loro utilizzo sono rappresentate da patologia coronarica nota, insufficienza cardiaca acuta o cronica di grado severo, infarto miocardico. I limiti della diagnostica ecografica con MdC sono sostanzialmente gli stessi della ecografia convenzionale: obesità, meteorismo, non adeguata preparazione, mancata collaborazione del paziente, lesioni profonde (VIII segmento), fegato steatosico, e soprattutto stretta dipendenza dall'operatore<sup>118-121</sup>.

Le già citate linee-guida della EFSUMB raccomandano l'uso della CEUS: per rilevare / escludere lesioni metastatiche; nei casi di risultati dubbi alla TC o alla RM; come diagnostica complementare alla TC ed alla RM nella valutazione pre-operatoria delle lesioni epatiche; per il follow-up oncologico dei pazienti; nella valutazione perioperatoria e nel follow-up post-operatorio in caso di terapie ablativ<sup>119</sup>.

Dal momento che gli inibitori della neoangiogenesi molto frequentemente determinano la necrosi delle lesioni senza cambiamento nel volume iniziale del tumore, un imaging funzionale appare particolarmente adatto per la valutazione precoce della risposta al trattamento, un compito per cui i criteri dimensionali RECIST appaiono inappropriati. Studi su vari tipi di

tumore trattati con target-therapies hanno di recente confermato che la CEUS permette di predire precocemente la risposta al trattamento, dimostrando variazioni nella perfusione tissutale tumorale e la comparsa di necrosi in assenza di variazioni di volume. Una rilevazione precoce dell'insorgenza di una resistenza secondaria può essere dimostrata da 6 a 9 mesi prima dell'aumento della massa tumorale, permettendo così un rapido aggiustamento terapeutico.

## MATERIALI E METODI

Tra il Dicembre 2007 e il Luglio 2011, 27 pazienti affetti da metastasi epatiche da cancro colo-rettale, e in attesa di iniziare un regime chemioterapico associato alla terapia biologica antiangiogenica con Bevacizumab, sono stati valutati per l'inclusione nello studio. I pazienti sono stati valutati in base ai seguenti criteri di inclusione: metastasi epatiche, sincrone o metacrone, da cancro colo-rettale; assenza di ripetizioni in altri organi, all'infuori del polmone; lesioni non resecabili d'emblée (numero, posizione, riserva funzionale epatica residua, condizioni generali del paziente); eleggibilità per terapia antiangiogenica con Bevacizumab; anamnesi negativa per eventi trombo embolici arteriosi o venosi; età non superiore agli 85 aa.

Dei 27 pazienti inizialmente selezionati, due sono stati esclusi per un riscontro anamnestico di precedenti eventi cardiovascolari (IMA), uno per una riferita intolleranza al MdC; un paziente ha scelto di essere seguito presso un altro centro per motivi familiari; infine, altri due pazienti hanno rifiutato il consenso informato.

Sono stati pertanto inclusi nello studio 21 pazienti con un totale di 22 tumori del colon-retto. Di questi, 13 pazienti (61,9%) erano di sesso maschile, 8 (38,1%) di sesso femminile, con un rapporto maschi:femmine di 1,62:1. L'età media era di  $62 \pm 11$  anni (range: 45 – 85).

Per 15 pazienti (71,4%) la presentazione di malattia è avvenuta in stadio IV, ovvero con metastasi epatiche sincrone. Il tumore primitivo era localizzato nel colon ascendente in 2 pazienti, nel colon trasverso in 2, nel discendente in 2, nel sigma in 5, nel retto in 3; una paziente presentava due neoplasie primitive sincrone, una nel colon trasverso ed una nel colon discendente. Solo uno dei tre pazienti con tumore primitivo del retto presentava anche ripetizioni polmonari; negli altri 14 pazienti le lesioni secondarie erano limitate al fegato. In 11 pazienti la chemioterapia associata al farmaco antiangiogenico è stata iniziata successivamente alla exeresi chirurgica della neoplasia primitiva; in due di questi è stata eseguita una procedura resettiva/ablative R1 contestualmente all'intervento (metastasectomia per biopsia in un caso, termoablazione di parte delle lesioni in un altro). Negli altri 4 pazienti si è deciso di iniziare subito il trattamento con farmaci chemioterapici e biologici, in vista di un'eventuale resezione sincrona del tumore primitivo e delle lesioni metastatiche.

I rimanenti 6 pazienti erano affetti da metastasi epatiche multiple metacrone, insorte dopo una DFS media di  $22,7 \pm 19,3$  mesi (range: 8 – 56). In questi pazienti, due dei tumori primitivi erano localizzati nel colon dx (stadio III A e III B), uno nel colon trasverso (stadio II A), uno nel colon discendente (stadio III C), uno nel sigma (stadio II A) ed uno nel retto (stadio III C).

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un regime chemioterapico di prima linea a base di Folati, 5-Fluorouracile ed Irinotecan (FOLFIRI), associato a terapia biologica (Bevacizumab). Il programma terapeutico prevedeva l'esecuzione di 6 cicli da 28 giorni di FOLFIRI + Bevacizumab (6 mesi), con successiva prosecuzione del Bevacizumab in mantenimento fino a progressione di malattia. Nel corso della somministrazione della terapia si è, ovviamente, proceduto alla valutazione ed alla gestione degli eventi avversi (AE) correlati alla somministrazione dei farmaci.

Su tutti i pazienti è stato eseguito uno studio perfusionale TC al tempo 0 nell'arco dei 5 giorni precedenti l'inizio della terapia; successivamente sono state eseguite rivalutazioni con studio perfusionale TC al tempo 1 (90

giorni) ed al tempo 2 (180 giorni). Lo studio perfusionale TC è stato eseguito con uno scanner a doppia sorgente e 64 x 2 detettori (Siemens Somatom Definition; Siemens Medical Solutions, Forchheim, Germany). I margini epatici sono stati localizzati con uno scan preliminare senza contrasto dell'addome superiore a respiro trattenuto. L'intervallo dell'asse z è stato settato per un range fisso di acquisizione di un volume di 200 mm, per includere l'intero fegato. Il mezzo di contrasto iodato ad alta concentrazione è stato iniettato in maniera frazionata (30 ml a 4 ml/s, 10 ml a 2 ml/s, 50 ml a 1 ml/s, seguiti da un flush di 20 ml di soluzione salina a 1 ml/s). Subito dopo l'iniezione è iniziata l'acquisizione dinamica a respiro libero (100 kV; 120 mAs; configurazione dei detettori: 24 x 1.2; tempo di rotazione: 0.33 sec; spessore: 3.0 mm); i pazienti sono stati invitati ad eseguire respiri lenti e costanti, per evitare artefatti da movimento. Tutti i dati sono stati poi trasferiti alla workstation ed elaborati con un software dedicato (Volume Perfusion CT Body, Syngo 2008 G; Siemens Medical Solutions), che ha permesso di ricavare i valori di BF, BV e PMB.

Contestualmente alle valutazioni perfusionali TC, in 11 pazienti (8 nel gruppo dei pazienti con metastasi sincrone, 3 in quello dei pazienti con

metastasi metacrone) è stata anche eseguita una valutazione delle lesioni secondarie e della loro vascolarizzazione tramite ecografia con mezzo di contrasto (CEUS); per limitare al minimo la variabilità operatore-dipendente tipica della metodica ecografica, gli esami CEUS sono stati eseguiti sempre dallo stesso operatore, un ecografista di provata esperienza e con una ampia casistica personale di esami ecografici con mezzo di contrasto. La CEUS è stata eseguita mediante somministrazione endovenosa di un mezzo di contrasto ecografico di II generazione costituito da microbolle contenenti esofluoruro di zolfo e stabilizzate da fosfolipidi (Sonovue; Bracco, Milano). Per l'esame è stata utilizzata una tecnica di scansione continua in real-time a basso indice meccanico (Contrast Tuned Imaging). Dopo un accurato esame ecografico convenzionale, si è proceduto all'iniezione endovenosa di un bolo di 2,4 ml di mezzo di contrasto, seguito da un flush di 5 – 10 ml di soluzione salina. La scansione continua è stata protratta per circa 180 secondi, in modo da comprendere tutte e tre le fasi vascolari (arteriosa, portale e tardiva); l'esame è stato registrato su supporto video. Al grado di enhancement ottenuto in fase arteriosa nella ROI selezionata è stato assegnato un punteggio da 0 a 3, intendendo con score 0, nessun enhancement, e con score 3, enhancement

intenso.

I dati ricavati dagli esami CEUS sono stati confrontati con quelli ottenuti tramite TC perfusionale, al fine di testare la concordanza delle due metodiche nella valutazione della vascolarizzazione e dell'evoluzione delle lesioni secondarie.

In base alle variazioni dimensionali delle lesioni, i pazienti sono stati stratificati come previsto dai criteri RECIST: PD (Progressive Disease), SD (Stable Disease), PR (Partial Response), CR (Complete Response).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Il primo controllo TC, effettuato a 3 mesi dall'inizio della terapia antiangiogenica (Tempo 1), ha permesso di stratificare i pazienti come segue, sulla base di quanto previsto dai criteri RECIST: 16 pazienti (76,2%) sono stati classificati come PR, altri 5 (23,8%) come SD; non ci sono stati pazienti con progressione di malattia, né con risposta completa.

Al secondo controllo, eseguito a 6 mesi (Tempo 2), le percentuali si sono modificate: 13 pazienti (61,9%) con PR, 1 paziente (4,8%) con CR, 5 pazienti (23,8%) con SD, e 2 pazienti (9,5%) con PD. Tra i pazienti inizialmente classificati come PR, uno è andato incontro a progressione di malattia, una non ha mostrato variazioni significative ed è stata pertanto classificata come stabile, mentre la terza ha presentato una remissione radiologica completa del quadro metastatico. Un paziente valutato come stabile al Tempo 1 ha, infine, presentato una progressione di malattia al Tempo 2.

Complessivamente, 13 pazienti hanno manifestato una progressione di malattia nel corso del follow-up, con una PFS media di  $10,7 \pm 3,9$  mesi (range: 6 – 19). I cinque pazienti con SD sono andati incontro a

progressione; quattro di questi, ed entrambi i pazienti con PD al Tempo 2, sono deceduti a causa del tumore. La paziente con risposta radiologica completa al Tempo 2 ha manifestato in seguito una progressione polmonare di malattia, ed è infine deceduta. Tra i pazienti classificati come PR al Tempo 2, due hanno manifestato una successiva progressione di malattia, e sono infine deceduti. Tre pazienti, invece, sono andati incontro ad un significativo downstaging delle lesioni epatiche, tale da permettere l'esecuzione di un intervento resettivo. In due di questi pazienti è insorta una recidiva epatica a distanza di alcuni mesi. La terza paziente ha, invece, mostrato progressione di malattia a livello peritoneale; per tale motivo è stata sottoposta ad intervento di peritonectomia + HIPEC, ma è comunque deceduta a distanza di alcuni mesi.

I restanti otto pazienti non hanno mostrato progressione di malattia nel corso del follow-up. Una paziente, classificata come PR, è stata in seguito sottoposta a termoablazione percutanea delle lesioni epatiche, ed è attualmente libera da malattia (DFS: 20 mesi). Una paziente di 85 anni, classificata come PR al tempo 1 e al tempo 2, è stata sottoposta a procedura ablativa percutanea; l'exitus è avvenuto qualche mese dopo per cause non correlate alla neoplasia. I rimanenti sei pazienti, tutti classificati come PR,

hanno mostrato un significativo downstaging delle lesioni epatiche, e sono in attesa di intervento resettivo; in tre di questi pazienti, che presentano tumore primitivo ancora in situ, è stata programmata l'exeresi della neoplasia, in associazione al primo stadio di una two-stage hepatectomy.

Reazioni avverse (Adverse Events, AEs) alla somministrazione di Bevacizumab si sono manifestate in 12 pazienti (57,1%). Gli AEs sono stati classificati secondo i Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) del NCI, v4.0 (2009). In 3 pazienti (14,3%) le reazioni avverse sono state di grado elevato ( $\geq 3$ ), e tali da comportare una sospensione della terapia con Bevacizumab: una paziente ha sviluppato una trombosi dell'arco aortico (AE di grado 4); in un paziente si è verificata una tromboembolia polmonare (grado 3 – 4); una paziente ha presentato rialzi pressori non controllati dalla somministrazione di terapia anti-ipertensiva (grado 3). Nei restanti casi, per lo più si è trattato di AEs di grado 1 – 2, controllabili con assunzione di terapia medica. Queste reazioni avverse comprendono epistassi (6 pazienti, 28,6%), mucosite orale (6 pazienti, 28,6%), ipertensione arteriosa (4 pazienti, 19%), artromialgie (3 pazienti, 14,3%), rettorragia (2 pazienti, 9,5%), TVP di un arto (1 paziente, 4,8%).

La sopravvivenza globale (OS) dei pazienti si attesta intorno ai  $26,8 \pm 18$  mesi. Complessivamente, 11 pazienti su 21 (52,4%) sono deceduti, 10 di essi (47,6%) per cause correlate al tumore. Dei 10 pazienti ancora viventi, una è attualmente in remissione completa; due pazienti sottoposti a chirurgia resettiva sono andati incontro a recidiva epatica di malattia; un paziente con malattia progressiva è in trattamento chemioterapico di seconda linea; e per i restanti sei pazienti è stato programmato un intervento resettivo con finalità curative.

L'end-point primario del nostro studio consisteva nel valutare la percentuale di pazienti con malattia metastatica non resecabile d'emblée, nei quali il trattamento con farmaci antineoangiogenici, associato alla chemioterapia, ha permesso di ottenere un downstaging delle lesioni, e, quindi, di programmare o eseguire procedure resettive e/o ablativo con finalità curativa.

Nel complesso, in 12 pazienti su 21 (57,1%) la terapia antiangiogenica ha determinato un downstaging significativo delle lesioni epatiche.

Nella metà dei casi i soggetti "responder" presentavano metastasi multiple, diffuse ad entrambi i lobi. Quattro di questi pazienti presentavano metastasi

sincrone, e in tre di questi il primitivo era tuttora in sede; negli altri due casi, invece, le lesioni ripetitive erano metacrone. Un paziente con secondarietà metacrone è stato sottoposto ad intervento combinato resettivo – ablativo con finalità curative, ma ha purtroppo presentato una recidiva di malattia epatica a distanza di circa 11 mesi. Negli altri cinque pazienti la risposta al trattamento ha permesso di programmare per l'immediato futuro un intervento resettivo – ablativo e/o una two – stage hepatectomy.

I rimanenti 6 pazienti presentavano lesioni secondarie in numero variabile da 1 a 3, ma giudicate inizialmente non resecabili a motivo delle loro dimensioni, della posizione e della vicinanza a strutture vascolari importanti (vene sovraepatiche, vena cava). L'unica paziente con metastasi metacrone ha risposto in maniera eccellente al trattamento, giungendo ad una scomparsa radiologica della lesione epatica (CR) al Tempo 2; successivamente è, purtroppo, sopraggiunta una progressione di malattia a livello polmonare, e la paziente è infine deceduta. Tra i pazienti con metastasi sincrone, due sono stati sottoposti ad intervento di resezione epatica con finalità curativa; in un caso la paziente ha sviluppato una recidiva di malattia epatica a distanza di circa 3 mesi; un'altra paziente ha sviluppato una progressione di malattia a livello peritoneale, decedendo

dopo alcuni mesi. In due casi è stata eseguita una termoablazione percutanea delle lesioni epatiche; una paziente è attualmente libera da malattia, la seconda è deceduta per cause non correlate al tumore. Una paziente, infine, ha presentato una risposta ottimale al trattamento, ed è in attesa di essere sottoposta a procedura resettiva.

Due erano gli end-points secondari dello studio: la valutazione della rilevanza clinica degli studi perfusionali TC; e la valutazione della rilevanza clinica degli studi CEUS e della loro concordanza con l'imaging TC.

I risultati degli studi TC perfusionali sono stati valutati per dirimere due questioni: le variazioni della neovascolarizzazione tumorale indotte dalla terapia; e la reale concordanza di queste variazioni con il decorso clinico della malattia.

Le misurazioni dei parametri perfusionali ottenute al Tempo 0, al Tempo 1 e al Tempo 2 sono riassunte nella Tabella 2. Tali parametri, valutati nel loro complesso, evidenziano una tendenza alla diminuzione nel corso della terapia antiangiogenica; tuttavia, non dimostrano variazioni statisticamente

significative tra il baseline e i controlli. Se si osservano i dati stratificati in base alla presenza (PR o CR) o assenza (SD o PD) di risposta alla terapia, si evidenzia un trend analogo all'interno dei due sottogruppi quando valutati singolarmente; non si osservano differenze statisticamente significative tra "Responders" e "Non-responders" per quanto concerne i valori di BF e BV; si osserva, invece, una differenza statisticamente significativa tra i due sottogruppi per quanto riguarda la PMB, che, in particolare al baseline, appare essere significativamente maggiore nel gruppo dei "Responders". Ciò suggerisce che le lesioni con maggiore PMB siano dotate di una rete vascolare ampiamente sviluppata, che potrebbe favorire una distribuzione ampia ed omogenea dei farmaci chemioterapici all'interno di tutto il tessuto neoplastico. Se questo dato fosse confermato da studi con casistica più ampia, il valore del PMB al baseline potrebbe configurarsi come un marker predittivo di risposta al trattamento antiangiogenico.

| <b>T0</b>  |             |                |                |
|------------|-------------|----------------|----------------|
|            | <b>Tot.</b> | <b>PR – CR</b> | <b>SD – PD</b> |
| <b>BF</b>  | 48,7 ± 10   | 52,1 ± 8,4     | 41,8 ± 9,9     |
| <b>BV</b>  | 9,2 ± 3     | 7,9 ± 2,3      | 11,9 ± 2,4     |
| <b>PMB</b> | 21,7 ± 7,6  | 25,8 ± 5,6     | 13,5 ± 3,2     |
| <b>T1</b>  |             |                |                |
|            | <b>Tot.</b> | <b>PR – CR</b> | <b>SD – PD</b> |
| <b>BF</b>  | 46,1 ± 8,5  | 48,7 ± 7,5     | 40,8 ± 8,3     |
| <b>BV</b>  | 8,7 ± 3,1   | 7,1 ± 2,1      | 11,7 ± 2,5     |
| <b>PMB</b> | 17,7 ± 4,1  | 19,8 ± 2,7     | 13,5 ± 3       |
| <b>T2</b>  |             |                |                |
|            | <b>Tot.</b> | <b>PR – CR</b> | <b>SD – PD</b> |
| <b>BF</b>  | 43,8 ± 7,1  | 44,7 ± 6,5     | 42,2 ± 8,4     |
| <b>BV</b>  | 8,2 ± 3,6   | 6,3 ± 2        | 11,9 ± 3,2     |
| <b>PMB</b> | 16,3 ± 2,7  | 17,4 ± 1,6     | 14 ± 3,1       |

Tabella 2 – Riassunto dei parametri perfusionali valutati al Tempo 0, al Tempo 1 e al Tempo 2

I risultati degli studi CEUS, eseguiti su 11 dei 21 pazienti arruolati nello studio, sono stati analizzati e confrontati con quelli degli studi perfusionali TC, per verificare la concordanza delle due metodiche nella valutazione del decorso della malattia. Sette di questi pazienti sono stati classificati come “Responder”, gli altri quattro come “Non-responder”.

Le metastasi epatiche presentavano i caratteri tipici delle lesioni secondarie: ipercogenicità variabile in fase arteriosa, ipoecogenicità in fase portale e tardiva. L’iperecogenicità della fase arteriosa consisteva in qualche caso in un enhancement omogeneo della lesione, mentre nella maggior parte dei casi era costituita da un orletto di enhancement periferico. Con l’eccezione rimarchevole di due esami sui 33 eseguiti (6%), la CEUS ha dimostrato un elevato grado di concordanza con la TC nella valutazione della malattia metastatica secondo i criteri RECIST, con una definizione del numero e delle dimensioni ed una individuazione delle aree di necrosi tumorale praticamente sovrapponibili a quelle della TC. Inoltre, le variazioni nella distribuzione e nel grading dell’enhancement in fase arteriosa hanno permesso di ottenere informazioni sulle modifiche del pattern vascolare delle lesioni in risposta alla terapia antiangiogenica; sebbene l’esiguità della casistica non consenta di produrre affermazioni

supportate da sufficiente significatività statistica, i dati da noi osservati suggeriscono che le metastasi dei pazienti Responder alla terapia antiangiogenica tendono a mostrare una diminuzione tanto dell'estensione, quanto dell'intensità dell'enhancement arterioso.

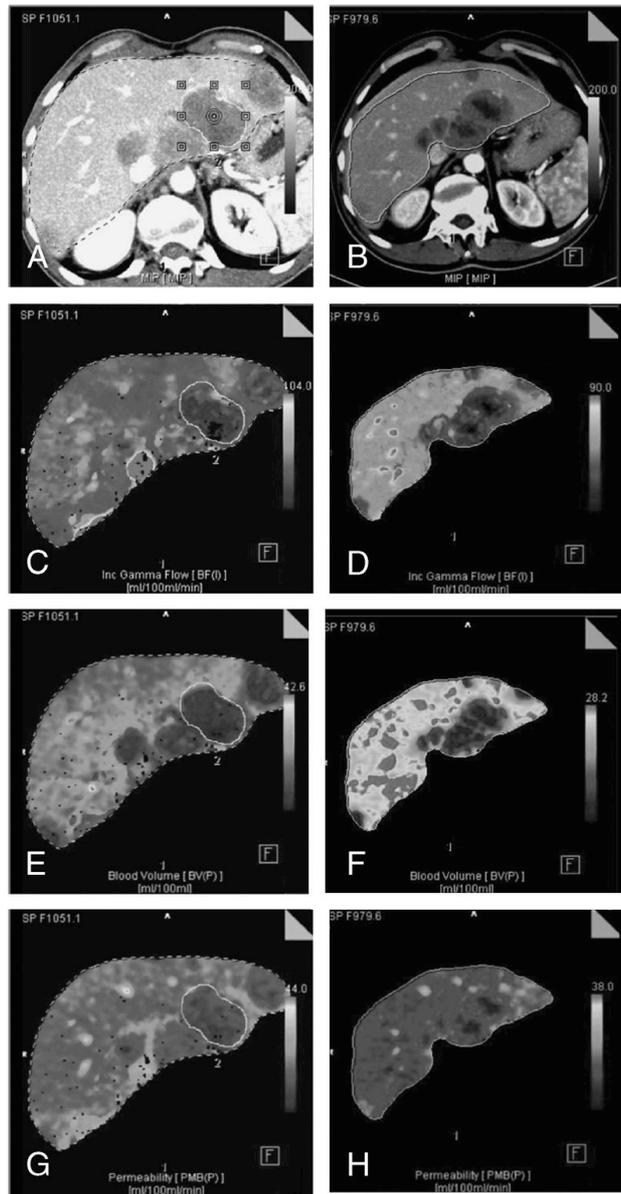


Fig. 7 – Studio perfusionale al Tempo 0 (A: basale; C: BF; E: BV; G: PMB) e al Tempo 2 (B, D, F, H).

## CONCLUSIONI

Il meccanismo principale della terapia con Bevacizumab risiede in una inibizione della neoangiogenesi tumorale, che comporta a sua volta una inibizione dell'ulteriore sviluppo della neoplasia ed un aumento della sua sensibilità alla chemioterapia tradizionale. L'efficacia della terapia biologica nel trattamento di I linea dei pazienti affetti da metastasi epatiche da cancro colo-rettale è stata ormai ampiamente dimostrata: l'aggiunta di Bevacizumab alla chemioterapia tradizionale permette, infatti, di ottenere un aumento significativo della sopravvivenza libera da malattia e della sopravvivenza globale media.

Uno studio, eseguito con tecniche di imaging, dello stato perfusionale del tumore e delle sue variazioni indotte dalla terapia antiangiogenica, potrebbe permettere una valutazione precoce dell'efficacia della terapia in atto, consentendo di stratificare i pazienti in responders e non-responders, e quindi di adattare al meglio il regime terapeutico alle loro esigenze.

La TC perfusionale ha dimostrato risultati non univoci in tal senso. Tuttavia, l'esiguità numerica delle casistiche finora esistenti non permette di trarre conclusioni statisticamente significative. Inoltre, la dose di

radiazioni attualmente necessaria per eseguire uno studio perfusionale è nettamente maggiore rispetto alla TC convenzionale.

L'ecografia con mezzo di contrasto potrebbe rappresentare un valido supporto, trattandosi di una metodica non invasiva, innocua e ripetibile in grado di raggiungere livelli di sensibilità e specificità molto elevati. La CEUS mantiene, però, tutti i limiti dell'esame ecografico convenzionale, incluse la stretta operatore-dipendenza e la difficoltà tecnica di esecuzione in alcune circostanze; inoltre, se la sensibilità e specificità sono paragonabili a quelle di una TC spirale, restano comunque inferiori rispetto alle potenzialità diagnostiche delle TC multistrato di ultima generazione. Pertanto, allo stato attuale, la CEUS si configura più come metodica complementare che come vera e propria alternativa alla TCMS.

## BIBLIOGRAFIA

1. Kopetz S, Chang GJ, Overman MJ, et al *Improved survival in metastatic colorectal cancer is associated with adoption of hepatic resection and improved chemotherapy* J Clin Oncol 2009; 27:3677-3683.
2. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, et al *Cancer incidence in five continents* Lyon: International Agency for Research on Cancer. Vol. VIII. IARC Scient. Publ. No. 155. 2002
3. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM *GLOBOCAN 2002 Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide*. IARC CancerBase No. 5, Version 2.0 – 2004 IARC Press, Lyon.
4. Jemal A, Siegel R, Xu J, et al *Cancer statistics, 2010* CA Cancer J Clin, 2010; 60:277-300.
5. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program Public-Use Data (1975-2008), National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch. Available at [www.seer.cancer.gov](http://www.seer.cancer.gov).
6. Grande E, Inghelmann R, Francisci S, Verdecchia A, Micheli A, Baili P, et al *Regional estimates of colorectal cancer burden in Italy* Tumori 2007; 93:352-359.
7. Associazione Italiana Registri Tumori. E&P anno 30, suppl. 2 – 2006. Available at [www.registri-tumori.it](http://www.registri-tumori.it).
8. World Cancer Research Fund (WCRF) and American Institute for Cancer Research (AICR) *Food, Nutrition and Prevention of Cancer: a*

- Global Perspective*. American Institute of Cancer Research. Washington, 1997.
9. Stewart BW, Kleihus P, Editors. *World Cancer Report*. Lyon: IARC Press. 2003.
  10. Kwak EL, Chung DC *Hereditary colorectal cancer syndromes: an overview* Clin Colorectal Cancer 2007; 6:340-344.
  11. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF *The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis* Gut 2001; 48:526-535.
  12. von Roon AC, Reese G, Teare J, et al *The risk of cancer in patients with Crohn's disease* Dis Colon Rectum 2007; 50:839-855.
  13. Turner JR *The gastrointestinal tract* In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC, editors. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, Professional Edition, 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2009.
  14. Park DH, Kim HS, et al *Clinicopathologic characteristics and malignant potential of colorectal flat neoplasia compared with that of polypoid neoplasia* Dis Colon Rectum 2008; 51:43-49.
  15. Edge SE, Byrd DR, Carducci MA, Compton CA, editors. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th Ed. New York: Springer; 2010.
  16. Berger AC, Sigurdson ER, LeVoyer T, et al *Colon cancer survival is associated with decreasing ratio of metastatic to examined lymph nodes* J Clin Oncol 2005; 23:8706–8712.
  17. Wang J, Hassett JM, Dayton MT, Kulaylat MN *Lymph node ratio: role in the staging of node-positive colon cancer* Ann Surg Oncol 2008; 15:1600–1608.

18. O'Connell JB, Maggard MA, Clifford YK *Colon Cancer Survival Rates with the new American Joint Committee on Cancer Sixth Edition Staging* J Natl Cancer Inst 2004; 96:1420-1425.
19. NIH consensus conference *Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer* JAMA 1990;264:1444-50.
20. André T, Boni C, Mounedij-Boudiaf L, et al; Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators *Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer* New Engl J Med 2004; 350:2343-2351.
21. Misiakos EP, Karidis NP, Kouraklis G *Current treatment for colorectal liver metastases* World J Gastroenterol 2011; 17:4067-4075.
22. Steele G, Ravikumar TS *Resection of hepatic metastases from colorectal cancer. Biologic perspective* Ann Surg 1989; 210:127-138.
23. Bengmark S, Hafström L *The natural history of primary and secondary malignant tumors of the liver. I. The prognosis for patients with hepatic metastases from colonic and rectal carcinoma by laparotomy* Cancer 1969; 23:198-202.
24. Chaudhury P, Hassanain M, Bouganim N, et al *Perioperative chemotherapy with bevacizumab and liver resection for colorectal cancer liver metastasis* HPB 2010; 12:37-42.
25. Bozzetti F, Doci R, Bignami P, et al *Patterns of failure following surgical resection of colorectal cancer liver metastases. Rationale for a multimodal approach* Ann Surg 1987; 205:264-270.

26. Foster JH *Treatment of metastatic disease of the liver: a skeptic's view* Semin Liver Dis 1984; 4:170-179.
27. Adam R, Avisar E, Ariche A, et al *Five-year survival following hepatic resection after neoadjuvant therapy for nonresectable colorectal [liver] metastases* Ann Surg Oncol 2001; 8:347-353.
28. Arnaud JP, Dumont P, Adloff M, et al *Natural history of colorectal carcinoma with untreated liver metastases* Surg Gastroenterol 1984; 3:37-42.
29. Abbas H, Lam V, Hollands M *Ten-year survival after liver resection for colorectal metastases: systematic review and meta-analysis* ISRN Oncology 2011; Epub ahead of print.
30. Wood CB, Gillis CR, Blumgart LH *A retrospective study of the natural history of patients with liver metastases from colorectal cancer* Clin Oncol 1976; 2:285-288.
31. Fong Y, Fortner J, Sun RL *Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases* Ann Surg 1999; 230:309-318.
32. Scheele J, Stangl R, Altendorf-Hoffmann A *Hepatic metastases from colorectal carcinoma: impact of surgical resection on the natural history* Br J Surg 1990; 77:1241-1246.
33. Adam R, Laurent A, Azoulay D, et al *Two-stage hepatectomy: a planned strategy to treat irresectable liver tumors* Ann Surg 2000; 232:777-785.

34. Altendorf-Hofmann A, Scheele J *A critical review of the major indicators of prognosis after resection of hepatic metastases from colorectal carcinoma* Surg Oncol Clin N Am 2003; 12:165-192.
35. Aloia TA, Vauthey JN, Loyer EM, et al *Solitary colorectal liver metastasis: resection determines outcome* Arch Surg 2006; 141:460-466.
36. Capussotti L, Muratore A, Mulas MM, et al *Neoadjuvant chemotherapy and resection for initially irresectable colorectal liver metastases* Br J Surg 2006; 93:1001-1006.
37. Abdalla EK, Vauthey JN, Ellis LM, et al *Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases* Ann Surg 2004; 239:818-825.
38. Isoniemi H, Österlund P *Surgery combined with oncological treatments in liver metastases from colorectal cancer* Scand J Surg 2011; 100:35-41.
39. Capussotti L (editor) *Surgical treatment of colorectal metastases* Springer-Verlag Italia, 2011.
40. Kim KH, Yoon YS, Yu CS, et al *Comparative analysis of radiofrequency ablation and surgical resection for colorectal liver metastases* J Korean Surg Soc 2011; 81:25-34.
41. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines for Colon Cancer – Version 2.2012. Available at [www.nccn.org](http://www.nccn.org).

42. Pawlik TM, Scoggins CR, Zorzi D, et al *Effect of surgical margin status on survival and site of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases* Ann Surg 2005; 241:715-722.
43. Charnsangavej C, Clary B, Fong Y, et al *Selection of patients for resection of hepatic colorectal metastases: expert consensus statement* Ann Surg Oncol 2006; 13:1261-1268.
44. Commission d'évaluation de la SFCD – ACHBT *Management of patients with synchronous colorectal liver metastases – Guidelines of the French Society of Digestive Surgery and the French Association of Hepato-Biliary Surgery and Liver Transplantation* Available at: [www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr).
45. Yoo PS, Lopez-Soler RI, Long WE, Cha CH *Liver resection for metastatic colorectal cancer in the age of neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab* Clin Colorectal Cancer 2006; 6:202-207.
46. Adam R, Delvart V, Pascal G, et al *Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy: a model to predict long-term survival* Ann Surg 2004; 240:644-657.
47. Sharma S, Camci C, Jabbour N *Management of hepatic metastasis from colorectal cancers: an update* J Hepatobiliary Pancreat Surg 2008; 15:570-580.
48. Tanaka K, Shimada H, Matsuo K, et al *Outcome after simultaneous colorectal and hepatic resection for colorectal cancer with synchronous metastases* Surgery 2004; 136:650-659.

49. Martin R, Paty P, Fong Y, et al *Simultaneous liver and colorectal resections are safe for synchronous colorectal liver metastasis* J Am Coll Surg 2003; 197:233-241.
50. Tomlinson JS, Jarnagin WR, De Matteo RP, et al *Actual 10-year survival after resection of colorectal liver metastases defines cure* J Clin Oncol 2007; 25:4575-4580.
51. Carmeliet P *Angiogenesis in health and disease* Nat Med 2003; 9:653-660.
52. Folkman J *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease* Nat Med 1995; 1:27-31.
53. Carmeliet P, Jain RK *Angiogenesis in cancer and other diseases* Nature 2000; 407:249-257.
54. Ferrara N *Role of Vascular Endothelial Growth Factor in regulation of physiological angiogenesis* Am J Physiol Cell Physiol 2001; 280:C1358-1366.
55. Risau W *Mechanisms of angiogenesis* Nature 1997; 386:671-674.
56. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al *The human gene for Vascular Endothelial Growth Factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing* J Biol Chem 1991; 266:11947-11954.
57. Houck KA, Ferrara N, Winer J, et al. *The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA* Mol Endocrinol 1991; 5:1806-1814.
58. Dor Y, Porat R, Keshet E *Vascular Endothelial Growth Factor and*

- vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis* Am J Physiol 2001; 280:C1367-1374.
59. Semenza G *Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1* Biochem Pharmacol 2002; 64:993-998.
  60. Stein I, Neeman M, Schweiki D, et al *Stabilization of Vascular Endothelial Growth Factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes* Mol Cell Biol 1995; 15:5363-5368.
  61. Ferrara N, Davis-Smyth T *The biology of Vascular Endothelial Growth Factor* Endocr Rev 1997; 18:4-25.
  62. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its receptors* FASEB J 1999; 13:9-22.
  63. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J *The biology of VEGF and its receptors* Nat Med 2003; 9:669-676.
  64. Stutfeld E, Ballmer-Hofer K *Structure and function of VEGF receptors* IUBMB Life 2009; 61:915–922.
  65. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition* Cell Signal 2007; 19:2003–2012.
  66. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K *Regulation of angiogenesis via Vascular Endothelial Growth Factor Receptors* Cancer Research 2000; 60:203-212.
  67. Karkkainen MJ, Makinen T, Alitalo K *Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research* Nat Cell Biol 2002; 4:E2-5.

68. Waltenberger J, Claesson-Welsh, L, Siegbahn A, et al *Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for Vascular Endothelial Growth Factor* J Biol Chem 1994; 269:26988-26995.
69. Zygmunt T, Gay CM, Blondelle J, et al *Semaphorin-PlexinD1 Signaling Limits Angiogenic Potential via the VEGF Decoy Receptor sFlt1* Dev Cell 2011; 21:301–314.
70. Park JE, Chen HH, Winer J, et al *Placental Growth Factor. Potentiation of Vascular Endothelial Growth Factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR* J Biol Chem 1994; 269:25646-25654.
71. Maru Y, Yamaguchi S, Shibuya M *Flt-1, a receptor for Vascular Endothelial Growth Factor, has transforming and morphogenic potentials* Oncogene 1998; 16:2585-2595.
72. Folkman J. In: DeVita VT, Hellman SMD, Rosenberg SA, editors. *Cancer: principles and practice of oncology*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. p. 2865–2682.
73. Hanahan D, Folkman J *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis* Cell 1996; 86:353-364.
74. Bergers G, Benjamin LE *Tumorigenesis and the angiogenic switch* Nat Rev Cancer 2003; 3:401-410.
75. Ruoslahti E *Specialization of tumour vasculature* Nat Rev Cancer 2002; 2:83-90.
76. Hanrahan V, Curie MJ, Gunningham SP *The angiogenic switch for Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D in the adenoma-carcinoma sequence during colorectal*

- cancer progression* J Pathol 2003; 200:183-194.
77. Jain RK *Tumour angiogenesis and accessibility: role of Vascular Endothelial Growth Factor* Semin. Oncol 2002; 29:3-9.
  78. Mole DR, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ *Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing* IUBMB Life 2001; 52:43-47.
  79. Jain RK *Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy* Nat Med 2001; 7:987-989.
  80. Yuan F, Chen Y, Dellian M, et al *Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody* Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:14765–14770.
  81. Willett CG, Boucher Y, di Tomaso TE, et al *Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer* Nat Med 2004;10:145–147.
  82. Kerbel RS *Antiangiogenic therapy: a universal chemosensitization strategy for cancer?* Science 2006; 312:1171–1175.
  83. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer* N Engl J Med 2004; 350:2335–2342.
  84. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, et al. *Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200* J

- Clin Oncol 2007; 25:1539–1544.
85. Jain RK *Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy* Nat Med 2001; 7:987–989.
  86. Jain RK *Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy* Science 2005; 307:58–62.
  87. Borgström P, Hillan KJ, Sriramarao P, Ferrara N *Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy* Cancer Res 1996; 56:4032–4039.
  88. Borgström P, Bourdon MA, Hillan KJ, et al *Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors in vivo* Prostate 1998; 35:1–10.
  89. Grothey A, Hedrick EE, Mass RD, et al *Response-independent survival benefit in metastatic colorectal cancer: a comparative analysis of N9741 and AVF2107* J Clin Oncol 2008; 26:183-189.
  90. Delaunoy T, Goldberg RM, Sargent DJ, et al *Mortality associated with daily bolus 5-fluorouracil/leucovorin administered in combination with either irinotecan or oxaliplatin: results from Intergroup Trial N9741* Cancer 2004; 101:2170-2176.
  91. Boehm S, Rothermundt C, Hess D, Joerger M *Antiangiogenic Drugs in Oncology: A Focus on Drug Safety and the Elderly – A Mini-Review* Gerontology 2010; 56:303-309.
  92. Knijn N, Tol J, Punt CJ *Current issues in the targeted therapy of*

- advanced colorectal cancer* Discov Med 2010; 9:328-336.
93. Iwasaki J, Nihira S *Anti-angiogenic Therapy Against Gastrointestinal Tract Cancers* Jpn J Clin Oncol 2009; 39:543–551.
94. El Zouhairi M, Charabaty A, Pishvaian MJ *Molecularly targeted therapy for metastatic colon cancer: proven treatments and promising new agents* Gastrointest Cancer Res 2011; 4:15-21.
95. Avastin Summary of Product Characteristics. Available at: [www.emea.europa.eu](http://www.emea.europa.eu).
96. Kamba T, McDonald DM *Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer* Br J Cancer 2007; 96:1788–1795.
97. Verheul HMW, Pinedo HM *Possible molecular mechanisms involved in the toxicity of angiogenesis inhibition* Nat Rev Cancer 2007; 7:475-485.
98. Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, et al *Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study* J Clin Oncol. 2008; 26:2013–2019.
99. Fuchs CS, Marshall J, Mitchell E, et al *Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results from the BICC-C Study* J Clin Oncol 2007; 25:4779-4786.
100. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al *New Response Evaluation Criteria in Solid Tumors: revise RECIST guideline (version 1.1)* Eur J Cancer 2009; 45:228-247.
101. Anzidei M, Napoli A, Zaccagna F, et al *Liver metastases from*

- colorectal cancer treated with conventional and antiangiogenic chemotherapy: evaluation with liver Computed Tomography Perfusion and Magnetic Resonance Diffusion-Weighted Imaging J Comput Assist Tomogr 2011; 35:690-696.*
102. Miles KA, Griffiths MR *Perfusion CT: a worthwhile enhancement? Br J Radiol 2003; 76:220-231.*
103. Lee TY *Functional CT: physiological models Trends Biotechnol 2002; 20:S3-10.*
104. Miles KA, Leggett DA, Kelley BB, et al *In vivo assessment of neovascularization of liver metastases using perfusion CT Br J Radiol 1998; 71:276-281.*
105. Axel L *Cerebral blood flow determination by rapid-sequence computed tomography: theoretical analysis Radiology 1980; 137:679-686.*
106. Sahani DV, Holalkere NS, Mueller PR, et al *Advanced hepatocellular carcinoma: CT perfusion of liver and tumor tissue. Initial experience Radiology 2007; 243:736-743.*
107. Bellomi M, Petralia G, Sonzogni A, et al *CT perfusion for the monitoring of neoadjuvant chemotherapy and radiation therapy in rectal carcinoma: initial experience Radiology 2007; 244:486-493.*
108. Kambadakone AR, Sahani DV *Body perfusion CT: technique, clinical applications, and advances Radiol Clin North Am 2009; 47:161-178*
109. Tan CH, Iyer R *Use of computed tomography in the management of colorectal cancer World J Radiol 2010; 2:151-158.*
110. Lee TY, Purdie TG, Stewart E *CT imaging of angiogenesis Q J Nucl*

Med 2003; 47:171-187.

111. Miles KA *Tumour angiogenesis and its relation to contrast enhancement on computed tomography: a review* Eur J Radiol 1999; 30:198-205.
112. Kan Z, Phongkitkarun S, Kobayashi S, et al *Functional CT for quantifying tumor perfusion in antiangiogenic therapy in a rat model* Radiology 2005; 237:151-158.
113. Pandharipande PV, Krinsky GA, Rusinek H, et al *Perfusion imaging of the liver: current challenges and future goals* Radiology 2005; 234:661-673.
114. Miles KA, Hayball MP, Dixon AK *Functional images of hepatic perfusion obtained with dynamic CT* Radiology 1993; 188:405-411.
115. Blomley MJ, Coulden R, Dawson P, et al *Liver perfusion studied with ultrafast CT* J Comput Assist Tomogr 1995; 19:424-433.
116. Oto A, Tamm EP, Szklaruk J *Multidetector row CT of the liver* Radiol Clin North Am 2005; 43:827-48.
117. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, et al *Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours* Eur J Cancer 2002; 38:1564-1579.
118. Basilico R, Filippone A, Mannetta G, et al *Mezzi di contrasto in ecografia*. In: Schiavone C, Romano M (Editors) *Manuale Italiano di Ecografia Internistica*. Antonio Delfino Editore, Roma, 2008.
119. Claudon M, Cosgrove D, Albrecht T, et al (EFSUMB Study Group) *Guidelines and good clinical practice recommendations for Contrast*

*Enhanced Ultrasound (CEUS) – Update 2008* *Ultraschall in Med* 2008; 29:28-44.

120. Quiaia E, D’Onofrio M, Palumbo A, et al *Comparison of contrast-enhanced ultrasonography versus baseline ultrasound and contrast-enhanced computed tomography in metastatic disease of the liver: diagnostic performance and confidence* *Eur Radiol* 2006; 16:1599-1609.
121. Larsen LPS *Role of contrast enhanced ultrasonography in the assessment of hepatic metastases: a review* *World J Hepatol* 2010; 2:8-15.