

Vecchi e nuovi marcatori del cancro del colon: dalla diagnosi alla prognosi

M. Plebani, D. Basso

Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento di Scienze Medico Diagnostiche e Terapie Speciali, Università degli Studi di Padova e Dipartimento Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università di Padova

Riassunto

Nella presente rassegna sono analizzati i marcatori biochimici e molecolari del carcinoma del colon-retto sporadico e familiare. Sono riportate le linee guida delle principali società scientifiche statunitensi ed europee di oncologia (ASCO, ESMO, ACS), biochimica clinica (NACB, EGTM) e gastroenterologia (AGA). Sulla base delle evidenze cliniche si raccomanda attualmente la ricerca del sangue occulto fecale per lo screening di soggetti asintomatici di età superiore ai 50 anni; la determinazione del CEA sierico viene raccomandata nel *follow-up* post-chirurgico ad intervalli trimestrali nei primi due anni dopo l'intervento. La ricerca delle mutazioni del gene APC su DNA genomico viene raccomandata nei probandi con sospetto di *familial adenomatous polyposis* (FAP) e nei familiari di soggetti affetti. Altri marcatori sierologici (CA19-9, TIMP-1) o la ricerca di geni mutati nelle feci (es. *k-ras*, *p53*), non sono al momento attuale raccomandati al di fuori di studi controllati.

Summary

Old and New Markers for colo-rectal cancer: from diagnosis to prognosis

In the present review, "old" and "new" markers of sporadic and hereditary colo-rectal cancer are considered. The guide-lines of the main European and USA Cancer (ASCO, ESMO, ACS), Clinical Biochemistry (NACB, EGTM) and Gastroenterological (AGA) associations are reported. The actual "evidence-based" recommendations are the use of fecal occult blood testing for screening asymptomatic subjects of more than 50 years; CEA is included in the post-operative surveillance, its determination being recommended every three months for the first two years after surgery. APC gene mutations should be tested in subjects with a suspicion of FAP and in relatives of affected individuals. Other serological markers (CA 19-9, TIMP-1) or the identification of mutated genes (e.g. *k-ras*, *p53*) in fecal samples are actually not recommended in routine clinical practice, their use to be included in controlled studies.

Introduzione

Il carcinoma del colon retto (CRC) è la terza neoplasia più frequente nel mondo. Si stima che questo tumore colpisca circa un milione di persone e che causi il decesso di circa mezzo milione di soggetti per anno¹. La maggior parte dei tumori del colon-retto è a localizzazione rettale (38%); meno frequenti sono i tumori del sigma (29%), del cieco (15%), del colon trasverso e delle flessure destra o sinistra (10%). Solo il 5% circa delle neoplasie colpisce il colon ascendente e solo il 3% il colon discendente². Negli stadi iniziali il CRC è spes-

so asintomatico. La progressione della malattia si accompagna alla comparsa di sintomi spesso aspecifici, che includono il dolore addominale intermittente, la nausea, il vomito, le modifiche dell'alvo e il sanguinamento. Masse palpabili sono rilevabili solo occasionalmente soprattutto nei tumori del colon destro, mentre la rettorragia può essere un riscontro relativamente frequente nei tumori del retto-sigma. L'assenza di sintomi specifici rende difficile la diagnosi soprattutto quando il tumore è ancora localizzato e passibile di terapia chirurgica radicale.

Tabella I. Stadiazione TNM (American Joint Committee on Cancer (AJCC)), secondo Dukes o Astler-Coller del carcinoma del colon-retto.

AJCC	TNM	Dukes	Astler-Coller
STADIO 0	Tis N0 M0		
STADIO I:	T1-2, N0, M0	A	A, B1
STADIO IIA	T3, N0, M0	B	B2
STADIO IIB:	T4, N0, M0	B	B3
STADIO IIIA:	T1-2, N1, M0	C	C1
STADIO IIIB:	T3-4, N1, M0	C	C2, C3
STADIO IIIC:	Qualsiasi T, N2, M0	C	C1, C2, C3
STADIO IV:	Qualsiasi T, qualsiasi N, M1		D

Tx: impossibile definire l'estensione del tumore; Tis: tumore in situ, limitato alla mucosa; T1: tumore che invade la sottomucosa; T2: tumore che invade la muscolare propria; T3: tumore che ha oltrepassato la muscolare propria ed invaso la sottosierosa, ma non gli organi o i tessuti adiacenti; T3: tumore che penetra nei tessuti pericolici o perirettali; Nx: impossibile definire lo stato dei linfonodi; N0: assenza di metastasi ai linfonodi regionali; N1: metastasi in 1-3 linfonodi pericolici o perirettali; N2: metastasi in 4 o più linfonodi pericolici o perirettali; Mx: impossibile definire la presenza o assenza di metastasi a distanza; M0: assenza di metastasi a distanza; M1: presenza di metastasi a distanza.

Dal punto di vista prognostico lo stadio del tumore alla diagnosi è l'indicatore attualmente più utilizzato. Alla base dei diversi sistemi di stadiazione vengono sempre considerati il grado di invasione della parete intestinale e il grado di interessamento dei linfonodi loco-regionali. Il sistema più utilizzato di stadiazione è la classificazione TNM dell'International Union Against Cancer (UICC)³ e dell'American Joint Committee on Cancer⁴. Nella classificazione TNM "T" si riferisce all'estensione locale della neoplasia primaria, "N" si riferisce al coinvolgimento dei linfonodi regionali, "M" si riferisce alle metastasi a distanza⁵. La Tabella I illustra i criteri di stadiazione del CRC.

La resezione chirurgica della neoplasia è il trattamento di scelta per la maggior parte dei pazienti affetti da CRC. La radio e/o la chemioterapia pre-chirurgica possono migliorare la prognosi nei casi di carcinoma rettale. La *Consensus Conference* del National Institute of Health (NIH) nel 1990 ha raccomandato il trattamento chemioterapico neoadiuvante per i pazienti affetti da CRC in stadio III⁶. Studi successivi effettuati su ampie serie cliniche hanno confermato la validità di questo approccio (chirurgia – chemioterapia) ai fini del miglioramento della sopravvivenza e della riduzione delle recidive di malattia a cinque anni⁷. Il ruolo della chemioterapia neoadiuvante nei CRC in stadio II (Dukes B) rimane ancora incerto⁸.

Nonostante la chirurgia sia potenzialmente curativa per la maggior parte dei CRC, circa il 40-50% dei pazienti operati sviluppa metastasi a distanza e/o recidiva locale di malattia dopo l'intervento⁹. Al fine di diagnosticare le recidive loco-regionali e/o le metastasi a distanza quando siano ancora resecabili, la maggior parte dei pazienti operati per CRC in stadio II o III viene solitamente sottoposta ad uno stretto *follow-up*, che prevede l'esame clinico associato alla radiologia (e.g. Rx torace, ecografia, TAC, risonanza magnetica) e/o alla colonscopia, e alla valutazione di una serie di parametri

di biochimica clinica oltre che dei marcatori tumorali.

Il CRC è stato uno dei primi tumori per i quali l'impiego di un marcatore tumorale, l'antigene carcinoembrionario (CEA), è stato utilizzato per la gestione clinica post-chirurgica.

Marker di carcinoma del colon-retto

Nella Tabella II vengono riportati i marcatori di CRC più ampiamente studiati. Viene anche riportata la fase di sviluppo attuale di ciascun marcatore ed il livello di evidenza per l'impiego clinico¹⁰.

Raccomandazioni per l'impiego dei marcatori tumorali nel carcinoma del colon-retto

Nella Tabella III sono riassunte le raccomandazioni per l'utilizzo dei marcatori tumorali nel CRC formulate dalle principali società statunitensi ed europee di oncologia, biochimica clinica e gastroenterologia.

Antigene Carcinoembrionario (CEA)

Screening

L'impiego del CEA per lo screening di popolazioni asintomatiche non è raccomandato. Questo marcatore possiede infatti scarse sensibilità e specificità che, associate ad una bassa prevalenza della neoplasia nella popolazione di soggetti asintomatici, ne precludono l'utilizzo per lo screening¹¹⁻¹³.

Prognosi

Come già indicato nell'introduzione, lo stadio della neoplasia alla diagnosi è un importante fattore prognostico. I livelli sierici di CEA correlano significativamente con lo stadio della neoplasia, ed in questo senso il CEA può essere considerato un indice prognostico. Questo biomarcatore sembra avere inoltre un significato prognostico indipendente dallo stadio del tumore

Tabella II. Marcatori di carcinoma del colon-retto. Livelli di evidenza secondo Hayes et al.¹⁰. Evidenza decrescente dal livello I al livello V.

Marker	Utilizzo proposto	Fase di sviluppo	Livello di evidenza	Rif.
Marker sierici				
CEA	Prognosi	I livelli pre-operatori possono offrire informazioni prognostiche, ma viene usato di rado per scopi clinici	III	11-13
	Follow-up post-chirurgico	In uso nella pratica clinica in associazione con le indagini radiologiche e la valutazione clinica	I	16-20
	Monitoraggio della terapia nelle neoplasie in stadio avanzato	In uso nella pratica clinica in associazione con le indagini radiologiche e la valutazione clinica	III	11-13
CA19-9	Prognosi, follow-up post-chirurgico e monitoraggio delle neoplasie in stadio avanzato	In corso di valutazione	III-IV	30,31
TIMP-1	Screening della popolazione ad alto rischio, prognosi	In corso di valutazione	III	32,34,35
Marker fecali				
Sangue occulto	Screening della popolazione asintomatica	Dimostrazione in ampi trials randomizzati che il suo impiego riduce la mortalità per CRC.	I	46-50
Ricerca di mutazioni genetiche del DNA fecale (<i>k-ras</i> , <i>p53</i> , etc.)	Screening della popolazione asintomatica	Maggiore sensibilità del sangue occulto	III	54,55
Marker genetici				
APC	Identificazione di soggetti ad alto rischio di FAP	Utilizzo clinico in centri di alta specializzazione	Esperti del settore	63,64
MSI	Pre-screening per HNPCC	Utilizzo clinico in centri di alta specializzazione	Esperti del settore	63,64
MLH1/MSH2/MSH6/PMS2	Identificazione di soggetti ad alto rischio di HNPCC	Utilizzo clinico in centri di alta specializzazione	Esperti del settore	63,64
Marker tessutali				
TS	Prognosi	In valutazione. Una meta-analisi suggerisce che elevati livelli sono un indice prognostico negativo. Metodo non standardizzato.	I	36
MSI	Predittivo della risposta alla chemioterapia con 5-FU nei tumori in stadio avanzato	In valutazione. Elevati livelli si associano ad una mancata risposta alla terapia con 5-FU.	III	36
	Prognosi	In valutazione. Tumori con MSI si associano nel 15% dei casi ad una migliore prognosi rispetto ai tumori senza MSI	I	37-39
	Predittivo della risposta alla chemioterapia	Risultati non univoci. In valutazione	III	68
DCC	Prognosi	In valutazione. Il valore prognostico è stato confermato in una meta-analisi. Mancata standardizzazione metodologica.	I	40,41
<i>k-ras</i> e <i>p53</i> mutati	Prognosi	Deboli indicatori prognostici. Poco proponibile il loro impiego per scopi clinici.	I	44,45

Tabella III. Raccomandazione per l'utilizzo dei marcatori tumorali nel carcinoma del colon-retto.

Marker	Applicazione (21,24,25,63)	ASCO	EGTM (15,65,66)	NACB 2002 (65,66)	ESMO	NCCN (53,67)	ACS (54)	USPSTF (55)	NACB 2007
CEA	Screening	No	No	No	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	No
	Prognosi	Si, se di aiuto nella pianificazione del trattamento chirurgico (24,25)	Si	Nessuna pubblicazione	Si	Si, se fa parte di un pannello necessario per un completamento dello staging	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Può essere combinato con altri fattori prognostici soprattutto per i pazienti in stadio II
	Follow-up post-chirurgico	Si, se il paziente è candidato per la terapia chirurgica o sistemica in caso di recidiva o metastasi (21)	Si, per l'identificazione precoce delle metastasi epatiche	Si, se la resezione delle metastasi epatiche è clinicamente indicata	Si	Si, se il paziente è candidato alla resezione chirurgica nel caso di diagnosi di recidiva	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Si, se il paziente è candidato alla terapia chirurgica o sistemica nel caso di diagnosi di recidiva e/o metastasi
Sangue occulto fecale	Monitoraggio della malattia in stadio avanzato	Si, se non ci sono altri test semplici a disposizione (24,25)	Si	Si, specialmente nel caso in cui non sia possibile monitorare in altro modo le dimensioni delle metastasi	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Si, specialmente se la malattia non può essere valutata in altro modo
	Screening dei soggetti asintomatici	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Si, per i soggetti di età superiore a 50 anni
Gene APC	Screening per FAP	(63)	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Si	Si	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Si
	Test iniziale di screening per NHPCC	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Si	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Si
Geni MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2)	Screening per NHPCC	(63)	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Si	Si	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Si
	Screening per NHPCC	(63)	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Si	Si	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Si
	Screening per NHPCC	(63)	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Si	Si	Nessuna pubblicazione	Nessuna pubblicazione	Si

ASCO=American Society of Clinical Oncology; EGTM=European Group on Tumor Markers; NACB=National Academy of Clinical Biochemistry; ESMO=European Society of Medical Oncology; AGA=American Gastroenterology Association; ACS=American Cancer Society; NCCN=National Comprehensive Network; USPSTF=United States Preventive Services Task Force. MMR=*mis-match repair*.

soprattutto nei pazienti con malattia in stadio II. Per questo motivo il suo utilizzo è stato proposto per individuare, fra i pazienti in stadio II, quelli che potrebbero trarre maggiore beneficio dalla chemioterapia neoadiuvante^{11-13,14}.

La determinazione dei livelli sierici del CEA alla diagnosi di CRC viene attualmente raccomandata sia perché può offrire indicazioni prognostiche, sia perché rappresenta il livello basale cui dovranno riferirsi le successive determinazioni effettuate durante il *follow-up* post-chirurgico¹⁵.

Monitoraggio post-chirurgico

I principali obiettivi del *follow-up* post-chirurgico dei pazienti sottoposti a resezione curativa per CRC sono i seguenti: 1. sostenere e rassicurare i pazienti; 2. valutare la comparsa di complicanze secondarie alla terapia; 3. individuare precocemente la presenza di metastasi a distanza e/o recidiva loco-regionale, quando siano ancora passibili di resezione chirurgica. Cinque diverse meta-analisi hanno confrontato l'outcome di pazienti sottoposti ad uno stretto monitoraggio rispetto a quelli non sottoposti a *follow-up* o sottoposti solo ad un minimo programma di controllo¹⁶⁻²⁰. Tutti questi studi giungono alla medesima conclusione: uno stretto regime di *follow-up* garantisce un miglioramento dell'outcome, anche se modesto, rispetto a programmi basati su un *follow-up* minimo. In una di queste meta-analisi viene anche dimostrato che solo negli studi dove veniva previsto l'utilizzo del CEA nel *follow-up* era possibile ottenere un impatto significativo sulla sopravvivenza¹⁹.

Le linee guida dell'ASCO (2005) e dell'NACB (2006) stabiliscono che il CEA deve essere determinato ogni tre mesi nei pazienti in stadio II o III per almeno tre anni dopo la diagnosi, se il paziente è un candidato alla terapia chirurgica e/o sistemica²¹.

Nella valutazione della determinazione seriale del CEA è necessario considerare quale sia il grado di variazione che deve essere considerato significativo, ossia indice di probabile recidiva e/o metastasi. La minima differenza fra due valori di campioni prelevati in tempi diversi che rifletta una reale variazione dell'andamento della malattia è conosciuta come differenza critica. Questa viene calcolata con una formula che nel suo computo tiene in considerazione sia la variabilità analitica (variabilità intrinseca al metodo di dosaggio dello specifico analita) sia la variabilità biologica (fluttuazione dei valori dell'analita intorno al livello omeostatico intra-individuale).

$$\text{Differenza critica} = 2,77 \cdot \sqrt{(CVa^2 + CVb^2)}$$

Dove CVa e CVb indicano rispettivamente la variabilità analitica e biologica espresse come coefficienti di variazione e la costante 2,77 definisce i limiti di confidenza della variabilità.

Tenendo conto che la variabilità biologica del CEA è stimata pari al 9,3% e che la variabilità analitica ottenibile con le attuali strumentazioni è pari al 4,7%, la differenza critica è: $2,77 \cdot \sqrt{22,09 + 86,49} = 28,86\%$.

In accordo con l'EGTM, si ritiene che un aumento del CEA sia significativo quando sia almeno pari al 30% del valore precedente. Questo aumento, se riconfermato su un secondo campione prelevato entro un mese, dovrebbe indirizzare il paziente ad approfondimenti diagnostici¹⁵. Questo criterio peraltro non è l'unico possibile. Infatti incrementi di minore entità (15-20%), ma persistenti in controlli ripetuti, dovrebbero comunque indirizzare il paziente ad ulteriori approfondimenti diagnostici¹⁵. Bisogna ricordare che il CRC può recidivare o progredire senza che si rilevi alcuna variazione dei livelli sierici di CEA. Pertanto, nei pazienti con sintomi sospetti, qualsiasi approfondimento diagnostico che il curante reputi necessario va eseguito indipendentemente dai livelli circolanti del CEA¹⁵.

Monitoraggio della malattia in stadio avanzato

La prognosi dei pazienti affetti da CRC in stadio avanzato è significativamente migliorata negli ultimi anni grazie alla introduzione di nuovi farmaci citotossici, come l'irinotecan e l'oxaliplatino, e l'impiego clinico di farmaci biologici quali il bevacuzimab (Avastin®) o il cetuximab (Erlotinib®)^{22,23}. Grazie all'impiego di questi farmaci la sopravvivenza dei pazienti con CRC metastatico è raddoppiata negli ultimi 10 anni^{22,23}. Tutti questi farmaci sono potenzialmente tossici e costosi; per questo è fondamentale stabilire al più presto possibile la loro efficacia nel prevenire la progressione neoplastica.

In accordo con le linee guida dell'ASCO (1996 e 2000), in questi pazienti i livelli sierici del CEA dovrebbero essere monitorati ogni 2-3 mesi durante il trattamento, qualora non vi sia la disponibilità di altri semplici test indici della risposta clinica^{24,25}. Il riscontro di due valori al di sopra del livello basale viene considerato suggestivo di progressione di malattia, anche in assenza di altre evidenze strumentali^{24,25}. Questo protocollo è stato confermato nel 2003 dall'EGTM¹⁵. Il gruppo europeo sottolinea peraltro che aumenti spurii e transitori di questo marcatore possono essere secondari alla terapia con 5-fluorouracile (5-FU) e levamisolo in assenza di progressione di malattia¹⁵. Pertanto la determinazione del CEA ad intervalli di 2-3 mesi dovrebbe essere effettuata nei pazienti affetti da CRC in stadio avanzato e sottoposti a terapia con farmaci citotossici e/o biologici. Un aumento dei livelli di CEA (es. >30%) dovrebbe essere considerato un indice di progressione di malattia, dopo avere escluso la possibilità di un riscontro falso positivo dovuto sia al rilascio secondario alla chemioterapia o alla presenza contestuale di condizioni patologiche benigne che causano aumento dei livelli sierici di CEA.

Farmacogenetica e valutazione del rischio di tossicità del 5-FU

La chemioterapia con 5-FU è utilizzata ancora ampiamente nell'approccio al CRC. L'azione citotossica

del 5-FU è secondaria alla incorporazione dei suoi fluorometaboliti attivi nel DNA e nell'RNA e alla capacità di inibire la timidilato sintetasi. Alla metabolizzazione/attivazione del 5-FU si oppongono gli enzimi del catabolismo delle pirimidine. La diidropirimidina deidrogenasi (DPD) è il primo enzima nella via del catabolismo del 5-FU e catalizza il passaggio limitante l'intera via metabolica. L'efficacia del farmaco può essere influenzata dai livelli di espressione della DPD nelle cellule neoplastiche: i tumori che esprimono bassi livelli di DPD spesso rispondono in maniera migliore al trattamento rispetto ai tumori ad elevata espressione dell'enzima.

La somministrazione del 5-FU e dei suoi derivati si può associare a fenomeni di tossicità grave. Una meta-analisi che ha considerato 1200 pazienti con cancro del colon retto trattati con 5-FU ha mostrato come la frequenza dei fenomeni di tossicità di grado 3 e 4 fosse pari al 31-34% con esiti letali nello 0,5% dei casi²⁶. In aggiunta a fattori di rischio quali l'età, livelli serici elevati di fosfatasi alcalina e la modalità di somministrazione del farmaco, il deficit dell'attività della DPD è un importante fattore che predispone all'instaurarsi dei fenomeni di tossicità da farmaco²⁷.

In una porzione di tali soggetti la ridotta capacità metabolica della DPD è geneticamente determinata. Il gene DYPD codificante la diidropirimidina deidrogenasi è presente in singola copia nel cromosoma 1 e consiste di 23 esoni. Rilevanti sono le mutazioni puntiformi IVS14+1G>A (DYPD*2A) e 2846 A>T. La ricerca di queste mutazioni mediante le attuali tecniche di biologia molecolare potrebbe essere di utilità per predire e quindi prevenire l'insorgenza di reazioni avverse²⁸.

Altri biomarcatori

CA 19-9

Il CA 19-9 è una mucina contenente l'epitopo Lewisia sialilato²⁹. Il CA 19-9 è un marker meno sensibile del CEA per la diagnosi di CRC^{30,31}. Sulla base dei dati della letteratura, la determinazione routinaria del CA 19-9 nei pazienti con CRC non è raccomandata.

Tissue inhibitor of metalloproteinases type 1 (TIMP-1)

L'inibitore tessutale delle metalloproteinasi di tipo 1 (TIMP-1) è una glicoproteina di 25 kDa caratterizzata da molteplici azioni biologiche, fra cui l'inibizione delle metallo proteinasi, lo stimolo della proliferazione cellulare e l'inibizione dell'apoptosi. I livelli sierici di questo inibitore sono significativamente più elevati nei pazienti affetti da CRC rispetto a soggetti sani, soggetti affetti da malattie infiammatorie croniche dell'intestino, o da adenomi o da carcinoma della mammella^{32,33}. Il TIMP-1 presenta inoltre migliore sensibilità e specificità rispetto al CEA nei pazienti affetti da CRC in stadio Dukes'A e B, (i.e., 58% vs 40% per una speci-

ficà fissata al 95%, e 56% vs 30% per una specificità fissata al 98%). TIMP-1 e CEA presentano sensibilità sovrapponibili nell'identificazione dei pazienti con carcinoma del retto in stadio precoce³². Altri studi hanno documentato il valore prognostico indipendente dallo stadio di TIMP-1^{34,35}. Sebbene l'insieme di questi studi preliminari sia promettente, non è ancora raccomandato l'uso routinario di TIMP-1 sia per la diagnosi che per la prognosi dei pazienti con CRC.

Marcatori Tessutali

Sono molteplici i biomarcatori tessutali studiati nel CRC. Fra questi la timidilato sintasi (TS)³⁶, l'instabilità dei micro satelliti (MSI)³⁷⁻³⁹, DCC (deleted in colon cancer)^{40,41}, PAI-1 (*urokinase plasminogen activator inhibitor*)^{42,43}, *k-ras* mutato⁴⁴, *p53*⁴⁵. Sulla base delle evidenze attuali, nessuno di questi biomarcatori tessutali è raccomandato per l'applicazione clinica di routine.

Marker fecali

Il marker fecale più utilizzato è la ricerca del sangue occulto (*fecal occult blood test* (FOBT)). La ricerca del sangue occulto fecale può essere effettuata mediante il test al guaiaco, che misura l'eme, oppure mediante tests immunochimici, che misurano la globina umana. Poiché l'eme può essere presente in alcuni vegetali, l'ingestione di questi alimenti può dar origine a risultati falsamente positivi se la ricerca del sangue occulto viene effettuata mediante il test al guaiaco. Causa di false positività sono anche alcuni farmaci, come gli anti-infiammatori non steroidei. I test immunochimici, al contrario del test al guaiaco, non sono influenzati da questi fattori e hanno una maggiore sensibilità e specificità⁴⁶. Un ampio numero di trials randomizzati effettuati su serie molto numerose di soggetti, ha documentato che la ricerca del sangue occulto, effettuata mediante il test al guaiaco, consente di ridurre la mortalità per CRC⁴⁷⁻⁵¹.

L'efficacia dell'impiego dei test immunochimici nel ridurre la mortalità per CRC non è ancora stata testata su ampie casistiche, ma è ragionevole ipotizzare che questo metodo sia altrettanto se non più accurato della ricerca del sangue occulto mediante il test al guaiaco⁵².

Lo screening del CRC viene raccomandato nei soggetti di età superiore ai 50 anni mediante la determinazione del sangue occulto fecale⁵³⁻⁵⁵. La determinazione dovrebbe essere effettuata su tre diversi e successivi campioni fecali⁵³.

La ricerca del sangue occulto fecale presenta una scarsa sensibilità nei confronti di CRC in stadio iniziale e una scarsa specificità nei confronti degli adenomi. Per tale motivo numerosi studi recenti sono focalizzati a ricercare altri marcatori fecali, soprattutto geni le cui mutazioni rappresentino eventi precoci nella carcinogenesi. Fra i marker fecali più studiati ricordiamo le mutazioni di *k-ras*, le mutazioni di *p53*, APC, l'instabilità dei microsatelliti e la metilazione di alcuni geni^{56,57}.

Tabella IV. Caratteristiche genetiche e cliniche dei carcinomi ereditari del colon-retto.

	CCR familiare	NHPCC	FAP	FAP attenuato	JPS	PJS
Ereditarietà	?	Autosomico dominante	Autosomico dominante	Autosomico dominante	Autosomico dominante	Autosomico dominante
Incidenza	1:200	1:2000	1:10,000	1:8,000-10,000	1:100,000	1:200,000
Geni	?? (candidati: MTHFR NAT1 NAT2 GSTM1 CYP1A1 XRCC1 XRCC3)	MLH1 (59%) MSH2 (38%) MSH6 (1,3%)	APC (>90%)	APC (>90%)	SMAD4, BMPR1A (53%)	STK11 (50-60%)
Rischio di CCR (%)	9-30	>80	Circa 100	80	50	39
Polipi	Pochi	Pochi	>100 nell'adolescente	Circa 30 colon prossimale	Centinaia nel colon e presenti in tutto il tratto GE	> 2 Peutz-Jeghers nel tratto GE
Età di insorgenza del CCR	50-60	44	39	49	34	46
Tumori di altri organi		sì	sì	sì	?	sì

CCR=carcinoma del colon-retto; NHPCC=*hereditary non polyposis colorectal cancer*;
FAP=*familial adenomatous polyposis*; PJS=*Peutz-Jeghers syndrome*; JPS=*familial juvenile polyposis*.

In assenza di studi che dimostrino una riduzione della mortalità per CRC secondaria alla introduzione nello screening di marcatori fecali molecolari, questi non sono ancora raccomandabili nella pratica clinica di routine.

Diagnostica molecolare del carcinoma del colon-retto ereditario

Il 20-30% di tutte le neoplasie del colon-retto ha una possibile causa genetica e il 3-5% dei casi si verifica in soggetti ad elevato rischio genetico nell'ambito di sindromi familiari. Molti dei geni responsabili dell'elevato rischio di carcinoma del colon-retto sono oggi conosciuti, mentre sono ancora in corso di definizione quelli responsabili del rischio di media entità. L'uso appropriato di test genetici può confermare la diagnosi a livello molecolare, particolarmente utile nei casi dubbi, e soprattutto può migliorare le strategie di sorveglianza per i soggetti ad alto rischio⁵⁸⁻⁶⁴.

Nella Tabella IV sono riassunte le caratteristiche genetiche e cliniche dei carcinomi del colon-retto familiari.

Nella FAP i polipi del colon si manifestano in giovane età (7-36 anni) e il carcinoma del colon-retto viene di solito diagnosticato intorno ai 39 anni. La diagnosi clinica di FAP viene effettuata qualora si individuino più di 100 adenomi del colon, oppure quando un individuo presenta adenomi multipli ed è parente di pri-

mo grado di un soggetto affetto. In persone che presentino tali caratteristiche si dovrebbe attualmente effettuare l'analisi genetica di FAP perché il riscontro di mutazioni germline è attualmente considerato uno dei criteri standard per la gestione di tale sindrome. Poiché i soggetti affetti hanno anche un aumentato rischio di neoplasie della tiroide, del pancreas, del duodeno o dell'ampolla, e dello stomaco, la gestione ottimale di soggetti portatori di mutazioni di FAP prevede anche lo stretto controllo della funzione tiroidea, epatica oltre alla colonscopia e all'EGDS.

Analisi genetica di APC

Virtualmente tutti i casi di FAP o delle sue varianti presentano mutazioni *germline* di APC.

APC ha 15 esoni e codifica una proteina di 309 KDa (2843 aa) che ha numerosi domini funzionali che mediano il legame a proteine intracellulari, quali la b-catenina, g-catenina, glicogeno sintetasi chinasi 3b, axina, tubulina, EB1 e hDLG. L'inattivazione biallelica di APC può mediare la tumorigenesi attraverso l'iperattivazione della via *Wingless/Wnt* cui segue l'overespressione di geni che favoriscono la crescita cellulare.

Sono state descritte più di 300 mutazioni di APC associate al CRC, e includono inserzioni, delezioni, mutazioni *nonsense* che causano *frameshift* o prematuri codoni di stop. Le mutazioni più frequenti sono localizzate fra i codoni 169 e 1393 essendo la delezione

AAAAG del codone 1309 quella più frequentemente riscontrata. Sono state descritte anche associazioni fra alcune mutazioni di APC e specifiche manifestazioni fenotipiche di FAP. Queste associazioni, anche se ancora in corso di definizione, potrebbero migliorare l'efficacia dello screening, della sorveglianza e del trattamento dei soggetti a rischio. Sono stati identificati anche due polimorfismi del gene APC (I1307K e E1317Q) che sembrano associarsi ad un aumentato rischio di carcinoma del colon anche senza causare poliposi. L'analisi di sequenza di APC dovrebbe essere effettuata in soggetti con sospetto di FAP o delle sue varianti e nei loro familiari.

Hereditary non polyposis colorectal cancer (NHPCC)

Si tratta di una sindrome familiare (*cancer family syndrome*) che si manifesta con l'insorgenza precoce di tumori non solo del colon-retto, ma anche di altri organi (endometrio, ovaio, stomaco, rene, colecisti, SNC, piccolo intestino). E' caratterizzata da mutazioni germline di due geni MLH1 e MSH2.

I criteri clinici per NHPCC sono i seguenti:
Amsterdam (tutti)

1. Un membro della famiglia con diagnosi di carcinoma del colon-retto (CCR) in età inferiore ai 50 anni
2. Due generazioni affette
3. Tre familiari affetti, uno dei quali di primo grado
4. FAP esclusa
5. Tumori verificati istologicamente.

Linee di Bethesda (un criterio sufficiente)

1. Individui appartenenti a famiglie che ricadono nei criteri di Amsterdam
2. Individui con due tumori NHPCC correlati, inclusi carcinomi del colon-retto sincroni o metacroni con neoplasie extra-coloniche.
3. Individui con carcinoma del colon-retto familiari di primo grado con individui affetti da CCR e/o carcinomi extra-colonici e/o adenomi del colon retto, con diagnosi di carcinoma effettuata prima dei 45 anni e di poliposi prima dei 40 anni.
4. Individui con carcinoma del colon-retto o carcinoma dell'endometrio diagnosticati prima dei 45 anni.
5. Individui con tumori del colon destro con un pattern indifferenziato diagnosticato in età inferiore ai 45 anni.
6. Individui con neoplasia del colon tipo cellule ad anello con castone diagnosticata prima dei 45 anni.
7. Individui con adenomi diagnosticati prima dei 40 anni.

In individui che ricadono nei criteri di Amsterdam possono presentare mutazioni germline nel 25-80% dei casi di MSH2 o MLH1.

L'American Gastroenterological Association ha recentemente raccomandato alcune linee guida per l'NHPCC. Fra queste l'analisi molecolare per l'instabi-

lità dei microsatelliti nel tessuto neoplastico e l'analisi *germline* per MSH2 o MLH1.

MSI

Tumori e adenomi che si sviluppano nell'ambito della NHPCC presentano caratteristicamente instabilità dei microsatelliti. Nel genoma umano ci sono circa 500.000 loci di microsatelliti, che sono ripetizioni in tandem di un numero variabile di nucleotidi (minimo 1 base). Il numero delle ripetizioni può variare enormemente (da 5 a 100 o più). Variazioni della lunghezza dei microsatelliti dovute a inserzioni o delezioni di un numero variabile di unità caratterizza quella che viene definita instabilità dei microsatelliti (MSI). L'MSI è conseguenza di difetti dei sistemi di riparazione dell'appaiamento errato (*mismatch*). Nel genoma umano i sistemi di riparo dell'appaiamento errato sono rappresentati da sei proteine: hMLH1, hMLH3, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMS1 e hPMS2. Queste proteine identificano ed eliminano sequenze anomale del DNA che si vengono a realizzare durante i processi di replicazione per effetto di agenti chimici o fisici. I microsatelliti sono delle regioni ad elevato rischio di mutazione. La mancata eliminazione di tali regioni mutate comporta la realizzazione di mutazioni *frameshift* nei geni a valle oltre che alla possibilità di avere proteine troncate e quindi non funzionali. Geni che risentono di mutazioni dei microsatelliti sono TGFβRII, E2F-4, BAX e ILGF. Nella carcinogenesi del colon-retto si riconoscono due vie principali: quella dovuta a mutazioni di oncogeni e geni oncosoppressori e quella dovuta ad instabilità dei microsatelliti. L'analisi MSI può consentire l'identificazione di soggetti e famiglie che probabilmente sono portatori di mutazioni *germline* di MSH2 o MLH1. Il test MSI consente inoltre di distinguere una FAP attenuata da un NHPCC. Il National Cancer Institute ha emanato delle linee guida per l'identificazione dell'instabilità dei microsatelliti nel carcinoma del colon-retto: vanno studiati due loci comprendenti due ripetizioni mononucleotidiche (Bat25 e Bat26) e tre loci di ripetizione dinucleotidica (D2S123, D5S346 e D17S250). I cancri possono essere così classificati in MSI di alto grado (instabilità dimostrata in più del 30-40% dei loci studiati), MSI di basso grado (instabilità dimostrata in meno del 30-40% dei loci studiati).

L'analisi MSI su tessuto neoplastico e/o su polipi viene considerata pertanto analisi di primo livello per individuare soggetti potenzialmente affetti da NHPCC, da sottoporre solo successivamente alla analisi genetica per MSH2 o MLH1.

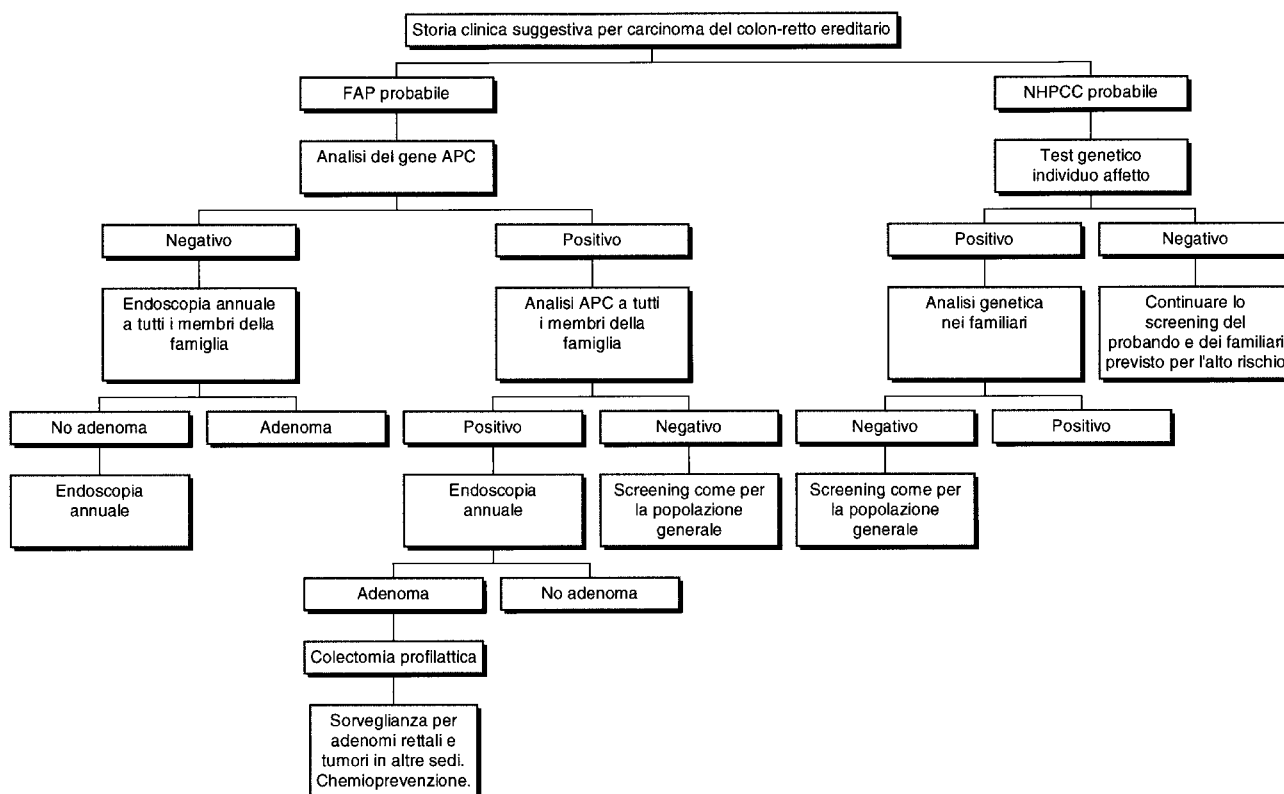
Carcinoma familiare del colon retto

E' la forma familiare più frequente (1:200). Non vi sono certezze sul ruolo patogenetico e diagnostico di mutazioni geniche specifiche. Tuttavia sembrano essere coinvolti geni quali MTHFR, NAT1, NAT2, GSTM1, CYP1A1, XRCC1 e XRCC3, la maggior

parte dei quali coinvolti nei meccanismi di detossificazione e attivazione di carcinogeni. Sono stati descritti per questi geni numerosi polimorfismi che sembrano in grado di modificare la funzione della proteina codificata. Lo studio di questi polimorfismi in casistiche selezionate, potrebbe chiarire alcuni aspetti della cosiddetta

predisposizione alla neoplasia del colon-retto oltre che rappresentare in futuro uno strumento per l'individuazione di soggetti con storia familiare ad alto rischio per neoplasia.

L'algoritmo proposto per lo studio del carcinoma del colon-retto familiare è quello che segue.



Bibliografia

1. Parkin DM, Bray F, Pisani P. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:74-108.
2. Davies RJ, Miller R, Coleman N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stools analysis. *Nature Rev Cancer* 2005; 5:199-209.
3. Sobin LH, Wittekind C (eds). *TNM: Classification of Malignant Tumors*. 6th Ed. New York, NY: Wiley-Liss; 2002.
4. Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al. (eds). *AJCC Cancer Staging Manual*. 6th Ed. New York, NY: Springer, 2002.
5. Compton CC, Greene FL. The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA Cancer J Clin* 2004; 54:295-308.
6. NIH Consensus Conference. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. *JAMA* 1990; 264:1444-50.
7. Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, Thome SD, Alberts SR, Haller DG, et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for Stage II and III colon cancer: who benefits and by how much. *J Clin Oncol* 2004; 22:1797-806.
8. Benson III AB, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, Flynn PJ, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for Stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22:3408-19.
9. Kievit J. Follow-up of patients with colorectal cancer: numbers need to test and treat. *Eur J Cancer* 2002; 38:986-99.
10. Hayes DF, Bast R, Desch CE, Fritsche H Jr, Kemeny NE, Jessup JM, et al. A tumor marker utility grading system (TMUGS): a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88:1456-66.
11. Fletcher RH. Carcinoembryonic antigen. *Ann Int Med* 1986; 104:66-73.
12. Duffy MJ. CEA as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin Chem* 2001; 47:624-30.
13. Goldstein MJ, Mitchell MJ. Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. *Cancer Invest* 2005; 23:338-51.
14. Grem J. The prognostic importance of tumor markers in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Curr Opin Oncol* 1997; 9:380-7.
15. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klappdor R, Lamerz R, et al. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer* 2003; 39:718-27.

16. Bruinvels DJ, Stiggelbout AM, Kievit J, van Houwelingen HC, Habbema DF, van de Velde CH. Follow-up of colorectal cancer: a meta-analysis. *Ann Surg* 1994; 219: 174-82.
17. Rosen M, Chan L, Beart RW, Vukasin P, Anthone G. Follow-up of colorectal cancer: a meta analysis. *Dis Colon Rectum* 1998; 41:1116-26.
18. Renehan AG, Egger M, Saunders MP, O'Dwyer ST. Impact on survival of intensive follow up after curative resection for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis of randomised trials. *Br Med J* 2002; 324:813-6.
19. Figueredo A, Rumble RB, Maroun J, Earle CC, Cummings B, McLeod R, et al. Follow-up of patients with curatively resected colorectal cancer: a practice guideline. *BMC Cancer* 2003; 3:26-39.
20. Jeffery GM, Hickey BE, Hider P. Follow-up strategies for patients treated for nonmetastatic colorectal cancer (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library Issue 2*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.; 2004.
21. Desch CE, Benson III AB, Somerfield MR, PJ Flynn, C Krause, CL Loprinzi, et al. Colorectal cancer surveillance: 2005 update of an American Society of Clinical Oncology practice guideline. *J Clin Oncol* 2005; 23:8512-9.
22. The Meta-Analysis Group in Cancer. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: an updated meta-analysis. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3766-75.
23. Meyerhardt JA, Mayer RJ. Drug therapy: systematic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005; 352:476-87.
24. Anonymous. Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14:2843-77.
25. Bast RC, Ravdin P, Hayes DF, Bates B, Fritsche H, Jessup JM, et al. 2000 Update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001; 19:1865-78.
26. Meta-Analysis Group In Cancer. Toxicity of fluorouracil in patients with advanced colorectal cancer: effect of administration schedule and prognostic factors. *J Clin Oncol* 1998; 16:3537-41.
27. van Kuilenburg AB. Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *Eur J Cancer* 2004; 40:939-50.
28. Yen JL, McLeod HL. Should DPD analysis be required prior to prescribing fluoropyrimidines? *Eur J Cancer* 2007; 43:1011-6.
29. Duffy MJ. CA 19-9 as a marker for gastrointestinal cancers: a review. *Ann Clin Biochem* 1998; 35:364-70.
30. Carpelan-Holmstrom M, Louhimo J, Stenman UH, Alfthan H, Haglund C. CEA, CA 19-9 and CA 72-4 improve the diagnostic accuracy in gastrointestinal cancers. *Anticancer Res* 2002; 22:2311-6.
31. Carpelan-Holmström M, Louhimo J, Stenman UH, Alfthan H, Järvinen H, Haglund C. CEA, CA242, CA19-9, CA 72-4 and hCGbeta in the diagnosis of recurrent colorectal cancer. *Tumor Biol* 2004; 25:228-34.
32. Holten-Andersen MN, Christensen IJ, Nielsen HJ, Stephens RW, Jensen V, Nielsen OH, et al. Total levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in plasma yield high diagnostic sensitivity and specificity in patients with colon cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8:156-64.
33. Holten-Andersen MN, Fenger C, Nielsen HJ, Rasmussen AS, Christensen IJ, Brünner N, et al. Plasma TIMP-1 in patients with colorectal adenomas: a prospective study. *Eur J Cancer* 2004; 40:2159-64.
34. Holten-Andersen MN, Stephens RW, Nielsen HJ, Murphy G, Christensen IJ, Stetler-Stevenson W, et al. High preoperative plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels are associated with short survival of patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6:4292-9.
35. Holten-Andersen M, Christensen, IJ, Nilbert M, Bendahl PO, Nielsen HJ, Brünner N, et al. Association between preoperative plasma levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and rectal cancer patient survival. A validation study. *Eur J Cancer* 2004; 40:64-72.
36. Popat S, Matakidou A, Houlston RS. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2002; 22: 529-36.
37. Samowitz WS, Curtin K, Ma KN, Schaffer D, Coleman LW, Leppert M, et al. Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev* 2001; 10:917-23.
38. Kohonen MRJ, Daniel JJ, Chan C, Lin BPC, Kwun SY, Dent OF, et al. Low microsatellite instability is associated with poor prognosis in Stage C colon cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:2318-24.
39. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23:609-18.
40. Shibita D, Reale MA, Lavin P, Silverman M, Fearon ER, Steele G, et al. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1996; 335:1727-32.
41. Popat S, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2005; 41:2060-70.
42. Skelly M, Troy A, Duffy MJ, Mulcahy H, Duggan C, Connell TC, et al. Urokinase-type plasminogen activator in colorectal cancer: relationship with clinicopathological features and patient outcome. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 1837-40.
43. Yang JL, Seetoo D, Wang Y, Ranson M, Berney CR, Ham JM, et al. Urokinase-type plasminogen activator and its receptor in colorectal cancer: independent prognostic factors of metastasis and cancer-specific survival and potential therapeutic targets. *Int J Cancer* 2000; 89:431-9.
44. Andreyev HJN, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the RASCA II study. *Br J Cancer* 2001; 85:692-6.
45. Munro AJ, Lain S, Lane DP. P53 abnormalities and outcome in colorectal cancer: a systematic review. *Br J Cancer* 2005; 92:284-9.
46. Allison JE, Tekawa IS, Ransom LJ, Adrain AL. A comparison of fecal occult blood tests for colorectal cancer screening. *N Engl J Med* 1996; 334:155-9.
47. Mandel JS, Bond JH, Church TR, Snover DC, Bradley GM, Schuman LM, et al. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood: Minnesota Colonoscopy Cancer Control Study. *N Engl J Med* 1993; 328:1365-71. (Erratum, *N Engl J Med* 1993; 329:672).

48. Kronborg O, Fenger C, Olsen J, Jorgensen OD, Sondergaard O. Randomized study of screening for colorectal cancer with fecal-occult-blood test. *Lancet* 1996; 348: 1467-71.
49. Mandel JS, Church TR, Bond JH, Ederer F, Geisser MS, Mongin SJ, et al. The effect of fecal occult-blood screening on the incidence of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 343:1603-7.
50. Hardcastle JD, Chamberlain JO, Robinson MH, Moss SM, Amar SS, Balfour TW, et al. Randomized controlled trial of fecal-occult-blood screening for colorectal cancer. *Lancet* 1996; 348:1472-7.
51. Towler BP, Irwig L, Glasziou P, Weller D, Kewenter J. Screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, hemocult. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; (2): CD001216. Update in: *Cochrane Database Syst Rev* 2007; (1): CD001216.
52. Allison JE. Colon cancer screening guidelines 2005: the fecal occult blood test option has become a better FIT. *Gastroenterology* 2005; 129:745-8.
53. National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology, Colorectal Cancer Screening. Version 1.2006. Available at http://www.nccn.org/physician_gls?PDF/colorectal_screening.pdf (data di consultazione: 2.2.2006).
54. Smith RA, Cokkinides V, Eyre HJ. American Cancer Society Guidelines for the Early Detection of Cancer. *CA Cancer J Clin* 2006; 56:11-25.
55. US Preventive Services Task Force. Screening for colorectal cancer: recommendations and rationale. *Ann Int Med* 2002; 137:132-41.
56. Davies RJ, Miller R, Coleman N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool testing. *Nature Rev Cancer* 2005; 5:199-209.
57. Imperiale T, Ransohoff D, Itzkowitz SH, Turnbull BA, Ross ME. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average risk population. *N Engl J Med* 2004; 351:2704-14.
58. Peltomaki P. DNA mismatch repair and cancer. *Mut Res* 2001; 488:77-85.
59. Calvert PM, Frucht HI. The genetics of colorectal cancer. *Ann Int Med* 2002; 137:603-12.
60. Lawes DA, SenGupta S, Boulos PB. The clinical importance and prognostic implications of microsatellite instability in sporadic cancer. *EJSO* 2003; 29:201-12.
61. Jarvinen HJ. Genetic testing for polyposis: practical and ethical aspects. *Gut* 2003; 52(Suppl 2):ii19-ii22.
62. Grady WM. Genetic testing for high-risk colon cancer patients. *Gastroenterology* 2003; 124:1574-94.
63. Giardiello FM, Brensinger JD, Petersen GM. AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology* 2001; 121:198-213.
64. Rowley PT. Inherited susceptibility to colorectal cancer. *Annu Rev Med* 2005; 56:539-54.
65. Van Cutsem EJ, Kataja VV. ESMO minimum clinical recommendations for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up of colon cancer. *Ann Oncol* 2005; 16 (Suppl 1):i16-7.
66. Tveit KM, Kataja VV. ESMO minimum recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of rectal cancer. *Ann Oncol* 2005; 16 (Suppl 1):i20-1.
67. National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology, Colon Cancer. Version 2.2006. www.nccn.org/physician_gls?PDF/colorectal_screening.pdf (data di consultazione: 14.2.2006).
68. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003; 349:247-57.