



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI MEDICINA & CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-DIAGNOSTICHE & TERAPIE SPECIALI
SEZIONE DI ANATOMIA PATOLOGICA GENERALE

DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA E ONCOLOGIA CHIRURGICA
XXIII ciclo

FATTORI PROGNOSTICI
DEL CARCINOMA COLO-RETTALE:
IL FENOTIPO E IL RUOLO
DELLE CELLULE TUMORALI ISOLATE
STUDIO PROSPETTICO

DIRETTORE DELLA SCUOLA : Ch.ma Prof. Paola ZANOVELLO

TUTOR: Chiar.mo Prof Massimo RUGGE

DOTTORANDO: Dott.ssa Claudia MESCOLO

Anno Accademico 2009-2010

INDICE

1. RIASSUNTO.....	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUZIONE.....	5
3.1 EPIDEMIOLOGIA	5
3.2 FATTORI DI RISCHIO DEL CCR.....	7
3.3 STORIA NATURALE E ALTERAZIONI MOLECOLARI.....	8
3.4 LOCALIZZAZIONE E ASPETTI MACROSCOPICI	9
3.5 ASPETTI ISTOLOGICI.....	9
3.6 VARIABILI ISTO-PROGNOSTICHE.....	9
4. PREMESSE E SCOPO DEL LAVORO	13
5. REVISIONE DELLA LETTERATURA.....	15
5.1 CCR E VARIABILI DEMOGRAFICHE.....	15
5.1.1 CCR ED ETÁ.....	15
5.1.2 CCR, ETÁ E SESSO	15
5.2 CCR E VARIABILI CLINICO-PATOLOGICHE	16
5.2.1 CCR: SEDE E STADIO.....	16
5.2.2 CCR: ISTOTIPO E GRADING.....	20
5.2.3 CCR SINCRONI E METACRONI.....	21
5.2.4 CCR E ADENOMI ASSOCIATI	24
5.2.5 CCR: LINFONODI E METASTASI LINFONODALI	25
5.2.6 CCR: ITC, FREQUENZA E IMPATTO PROGNOSTICO.....	33
6. PAZIENTI E METODI.....	37
6.1 PAZIENTI.....	37
6.2 METODI (GRUPPO A)	41
6.2.1 RACCOLTA DEI DATI CLINICO-PATOLOGICI.....	41
6.2.2 PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO.....	41
6.2.3 REDAZIONE DEL REFERTO ANATOMO-PATOLOGICO.....	42
6.2.4 DATA BASE	44
6.2.5 MODALITÀ DI RECUPERO DEI DATI DI FOLLOW-UP	47
6.3 METODI (GRUPPO B).....	48
6.4 METODI (GRUPPO C).....	48
6.4.1 ISTOLOGIA E IMMUNOISTOCHEMICA.....	48
7. ANALISI STATISTICA	51
8. RISULTATI	53
9. DISCUSSIONE	101
10. CONCLUSIONI	107
11. BIBLIOGRAFIA	109

1. RIASSUNTO

1.1 SCOPO:

Il carcinoma del colon-retto (CCR) è la seconda neoplasia maligna causa di morte nel mondo occidentale.

La presenza di metastasi nei linfonodi regionali è il fattore prognostico più importante e, distinguendo lo stadio III (pN1/2) dagli stadi I e II (pN0) (in assenza di metastasi extranodali) identifica i pazienti da sottoporre a terapia adiuvante.

Tuttavia, il 20-30% dei pazienti senza metastasi linfonodali (pN0) sviluppa malattia recidiva. Esiste, pertanto, tra gli stadi precoci, un sottogruppo di soggetti "portatori" di metastasi occulte che non sono identificabili con le comuni tecniche di valutazione.

La necessità di nuovi e più accurati fattori prognostici ha indirizzato lo scopo di questo lavoro alla ricerca di parametri morfologici clinicamente rilevanti per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

1.2 PAZIENTI E METODI

Lo studio include:

- Gruppo A: 1606 pazienti consecutivi con CCR sottoposti a resezione curativa;
- Gruppo B: 944 pazienti pN0 (estratti dal gruppo A);
- Gruppo C: 361 pazienti consecutivi pN0 (estratti dal gruppo B, escludendo i cancri rettali sottoposti a terapia neo-adiuvante) nei cui linfonodi è stata indagata la presenza/prevalenza di Cellule Tumorali Isolate.

1606 resezioni consecutive colo-rettali sono state campionate e refertate secondo un protocollo standardizzato per raccoglierne le caratteristiche clinico-patologiche.

Da 361 resezioni colo-rettali, campionate e refertate come sopra, sono stati analizzati con metodica immunocistochemica (anticorpo anti-citocheratina MNF116)

5920 linfonodi, per ognuno dei quali sono state esaminate due sezioni a distanza di 80-100 µm.

Le caratteristiche clinico-patologiche sono state comparate tra loro e con i risultati dell' *outcome* secondo i parametri "ricorrenza di malattia" e "decesso per malattia".

1.3 RISULTATI

(a) L'importanza di variabili isto-patologiche (Profondità d'infiltrazione, *Status* Linfonodale, Pattern di crescita, presenza di Invasione Vascolare, insorgenza in Sede Rettale, Grado di de-differenziazione tumorale) come fattori prognostici è stata consolidata;

(b) Parametri indipendenti che influenzano la recidiva in assenza di metastasi linfonodali sono : Grado di de-differenziazione tumorale , Istotipo, *Pattern* di crescita e Reazione flogistica intra e peritumorale;

(c) Analisi in multivariata dimostrano che la presenza di ITC nei linfonodi di pazienti con CCR pN0 è l'unica variabile che influenza significativamente la prognosi.

1.4 CONCLUSIONI

Il presente studio conferma l'importanza di parametri isto-patologici "secondari" nella stratificazione del rischio di ricorrenza di malattia, in particolare delle Cellule Tumorali Isolate.

I risultati ottenuti chiariscono il ruolo delle ITC come indicatori prognostici clinicamente rilevanti e ne suggeriscono il possibile utilizzo come criterio di selezione di pazienti pN0 da sottoporre a terapia adiuvante.

2. ABSTRACT

2.1 AIM:

To date, lymph node (LN) involvement is the most important prognostic factor in patients undergoing radical surgery for CRC, and pN+ve status identifies patients who require adjuvant chemotherapy.

About 20-30% of patients with pathological-negative LNs (pN0), however, develop recurrent disease.

Thus, there is a subgroup of pN0-CRC patients harbouring occult metastatic disease that is undetected by the current pathological and clinical evaluations.

The need for more accurate prognostic factors has addressed the aim of this study to look for new morphologic reliable markers.

2.2 PATIENTS AND METHODS

The study included:

- Group A: 1606 consecutive pN0-CRC patients surgically treated at the University of Padova between 2002 and 2008;
- Group B: 944 pN0-CRC patients (obtained from group A);
- Group C: 361 consecutive pN0-CRC patients (obtained from group B, ruling out rectal carcinomas undergone neoadjuvant radio-chemotherapy) in order to immunohistochemically assess the prevalence of ITC and the clinical outcome of pN0-ITC+ve-CRC patients.

All the 1606 surgical resections were sampled and diagnosed at the Pathology Department according to a standardized procedure in order to recorder the clinico-pathological features.

From 361 pN0 cases, ITC detection has been performed on serial sections (at different levels: 80-100 μ m) of the 5920 originally dissected (formalin fixed paraffin embedded) lymph nodes. Each section has been stained with appropriate antibodies to reveal the presence of tumoral cells undetected at the routine observation.

The clinico-pathological features has been compared between each other and the clinical *outcome*.

2.3 RESULTS

(a) The importance of histopathological variables (Infiltration Depth, Lymphonodal *Status*, Growth Pattern, Vascular Invasion, Rectal localization, Tumoral de differentiation Grade) as prognostic factors has been confirmed;

(b) Independent paramenters influencing relapse in negative nodes are : Tumoral de differentiation Grade, Histotype, Growth Pattern and peri and intra neoplastic inflammation;

(c) Multivariate Analisis shows that ITC presence in nodes of CRC pN0 patients is the only variable significantly influencing prognosis.

2.4 CONCLUSIONS

The present study confirms the importance of those histopathological parameters which are not primary involved in patient stratification risk of relapsing disease, in particular of ITC.

Our results elucidate the role of ITC as prognostic factors clinically significant and they suggest the possible utilization of ITC as selection criteria in pN0 patients for adjuvant therapy.

3. INTRODUZIONE

3.1 EPIDEMIOLOGIA

Nei Paesi Occidentali, il cancro del colon-retto (CCR) rappresenta il secondo tumore per incidenza e mortalità dopo il cancro del polmone (nell'uomo) e il cancro della mammella (nella donna). Nella popolazione mondiale, l'incidenza del CCR è di circa 800.000 nuovi casi/anno; è più frequente nel sesso maschile e il rischio aumenta progressivamente con l'età (figura 1).

Il rapporto 2006 sui tumori in Italia, realizzato dall'Associazione Italiana Registri Tumori (AIRT) e pubblicato come supplemento (*Suppl. 2*) a *Epidemiologia & Prevenzione* (la rivista dell'Associazione Italiana di epidemiologia che offre un quadro completo e aggiornato dell'incidenza e della mortalità della patologia oncologica in Italia) ha analizzato i dati di incidenza (dal 1998 al 2002) e mortalità (dal 1970 al 2002) oncologica offrendo una fotografia molto aggiornata che permette di valutare l'andamento di questa malattia nel tempo. I dati dell'AIRT per il CCR indicano che, nel tempo, si è realizzata una progressiva divaricazione tra tasso di mortalità (che è diminuito) e tasso di incidenza (che è aumentato) (figura 2). Secondo le stime più recenti, ogni anno, circa 30.000 persone (45 nuovi casi/anno ogni 100.000 abitanti) si ammalano di CCR e, di queste, poco più della metà (circa 18.000) ne muore.

Esiste una variabilità geografica nella incidenza del CCR in Italia: i tassi più elevati si registrano nell'Italia centro-settentrionale con una incidenza quasi doppia rispetto all'Italia meridionale e insulare (figura 3).

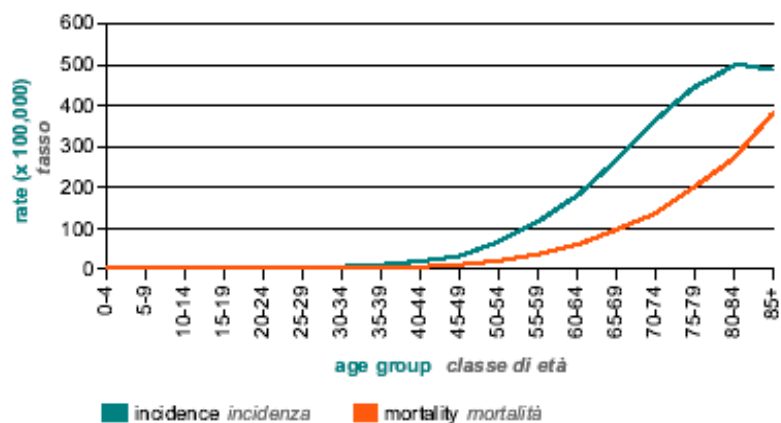


FIGURA 1. Tassi di incidenza e mortalità per CCR nelle diverse classi di età.

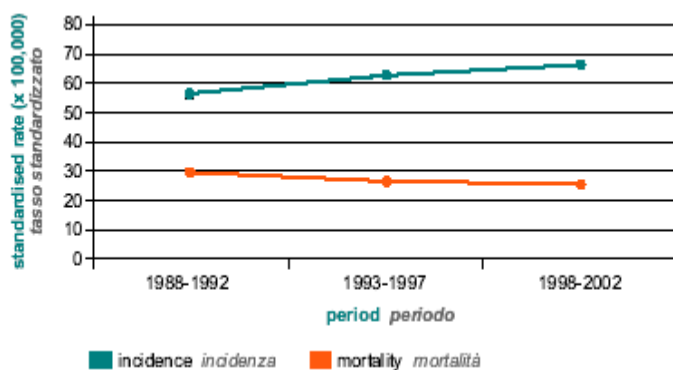


FIGURA 2. Tassi di incidenza e mortalità per CCR nel tempo.

♂ Maschi Males

♀ Femmine Females

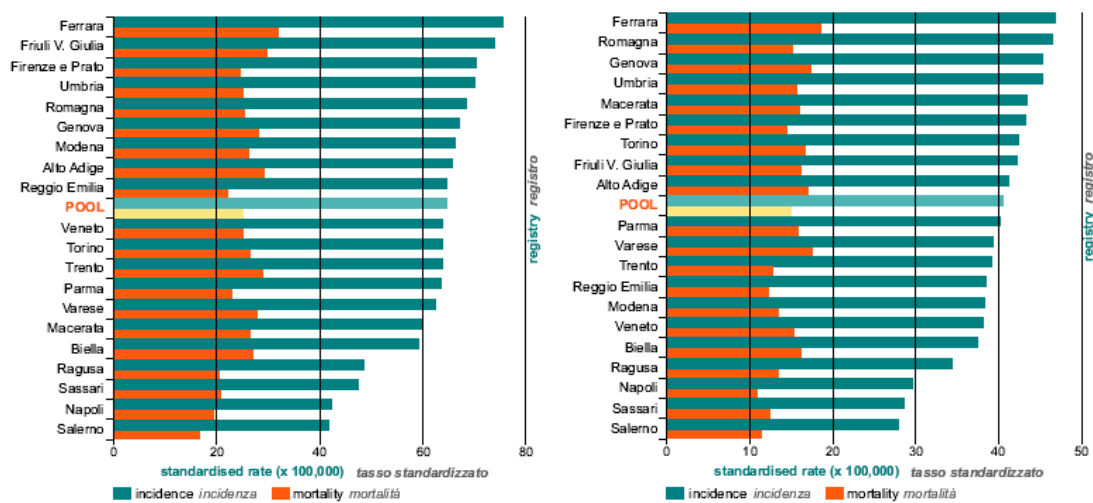


FIGURA 3. Tassi di incidenza e mortalità per CCR nelle diverse regioni italiane.

3.2 FATTORI DI RISCHIO DEL CARCINOMA COLORETTALE

a) FATTORI AMBIENTALI. Il 95% dei CCR è sporadico e riconosce una etiologia multifattoriale. Studi epidemiologici e sperimentali hanno dimostrato che esistono fattori ambientali (in particolare relativi allo stile di vita e all'alimentazione) che si associano a aumentato rischio di CCR. Tra i fattori dietetici, i più documentati sono l'eccessiva assunzione di grassi animali (burro, latte, latticini e uova), di carni rosse e una dieta ipercalorica con zuccheri e carboidrati. Un'alimentazione ricca di vegetali, fibre e cereali è associata ad un minore rischio di CCR.

b) FATTORI EREDITARI. Indipendentemente dai fattori ambientali, è possibile ereditare il rischio di ammalarsi di CCR se nella famiglia di origine si sono manifestate alcune malattie che predispongono alla formazione di polipi e tumori intestinali. Tra queste, le più note sono le poliposi familiari (la poliposi adenomatosa familiare o FAP, la sindrome di *Gardner*, la sindrome di *Turcot*) e il cancro del colon-retto ereditario non associato a poliposi (HNPCC o sindrome di Lynch). Queste sindromi sono responsabili di una piccola parte dei tumori (2-5% circa), ma il loro studio ha permesso di identificare alcune mutazioni genetiche alla base dei CCR e di allestire *tests* genetici per scoprire precocemente, all'interno delle famiglie affette, i portatori della malattia consentendo di attuare adeguati provvedimenti di prevenzione e sorveglianza periodica a partire dall'età giovanile.

c) ETÀ. Fra i fattori non ereditari si ritiene importante l'età: tra 60-64 anni l'incidenza è dieci volte superiore anni rispetto a quella tra 40-44 anni.

d) ANAMNESI PERSONALE E FAMILIARE. Pazienti con familiarità per CCR o con storia clinica personale di adenomi coloretali e/o di pregressa neoplasia maligna (in particolare CCR, carcinoma uterino, mammario ed ovarico) risultano a maggiore rischio di sviluppare un tumore al colon-retto. Si stima, infatti, che i parenti di primo

grado di persone affette da cancro del colon-retto abbiano un rischio aumentato di 2-3 volte rispetto al rischio generico.

e) MALATTIE DELL'INTESTINO. Le malattie croniche infiammatorie intestinali (IBD: rettocolite ulcerosa e morbo di Crohn) sono condizioni precancerose e, come tali, rendono necessari controlli periodici per l' aumentato rischio di CCR cui sono associate.

3.3 STORIA NATURALE E ALTERAZIONI MOLECOLARI

La cancerogenesi coloretale (che, come tutti i processi neoplastici, è la tappa finale di un itinerario a stadi multipli) avviene attraverso alterazioni molecolari specifiche che destabilizzano il genotipo e corrispondono alla acquisizione di fenotipi progressivamente meno differenziati.

Sono stati descritti due tipi di instabilità genetica: 1) instabilità cromosomica: modificazione quantitativa di materiale cromosomico e conseguentemente funzionale del DNA; 2) instabilità dei microsatelliti: mutazioni di geni del *mismatch repair system* che riparano gli errori di replicazione del DNA (errori a cui le sequenze microsatellitari sono particolarmente suscettibili).

La mutazione di APC è documentata nelle alterazioni fenotipiche più precoci (cripte aberranti) ed ha, dunque, un ruolo preminente nell'innescare della cancerogenesi coloretale.

Mutazioni di P53 intervengono nelle fasi più tardive (trasformazione da displasia di alto grado a carcinoma invasivo).

I fenotipi (lesioni precancerose) che precedono lo sviluppo del CCR sono la cripta aberrante e l'adenoma (con neoplasia non invasiva di basso e alto grado).

3.4 LOCALIZZAZIONE E ASPETTI MACROSCOPICI

Il CCR predilige il colon distale anche se, in questi ultimi anni, è descritto uno “*shift*” prossimale. Molti studi, inoltre, hanno dimostrato la preferenziale localizzazione prossimale dei CCR sporadici associati ad instabilità dei microsatelliti.

Nelle forme avanzate, il CCR ha un aspetto esofitico, ulcero-vegetante (più frequente a destra) o infiltrativo, anulare-stenosante (più frequente a sinistra).

3.5 ASPETTI ISTOLOGICI

Il CCR è un adenocarcinoma e il grado di similitudine delle ghiandole neoplastiche a quelle native ne definisce il grado di differenziazione.

Accanto all'adenocarcinoma NAS (il più comune), esistono delle varianti con specificità molecolari, istologiche e prognostiche: carcinoma mucinoso, midollare, *signet ring* (che si localizzano più frequentemente a destra e si associano ad instabilità microsatellitare), il carcinoma adenosquamoso o squamoso puro e il carcinoma indifferenziato.

3.6 VARIABILI ISTO-PROGNOSTICHE DEL CCR

La caratterizzazione istologica del CCR comprende la valutazione di variabili morfologiche la cui importanza è legata alla prognosi. Per questo motivo, tali variabili devono essere ricercate e valutate accuratamente attraverso un attento esame macroscopico ed istologico del pezzo operatorio.

Esse possono essere suddivise in:

variabili morfologiche associate alla neoplasia primitiva:

- 1) Dimensioni e/o estensione parietale della neoplasia
- 2) Distanza dal margine di resezione: definisce la radicalità di exeresi
- 3) Istotipo
- 4) Grado di differenziazione
- 5) Indice mitotico
- 6) Invasione neoplastica vascolare
- 7) Invasione neoplastica perineurale
- 8) Angiogenesi tumorale
- 9) Infiltrato infiammatorio intra/peritumorale

variabili morfologiche associate ai linfonodi regionali:

- 1) Numero dei linfonodi esaminati:
- 2) Numero dei linfonodi metastatici
- 3) Sede dei linfonodi metastatici
- 4) Stato reattivo dei linfonodi non metastatici (iperplasia linforeticolare correla positivamente con la prognosi)

variabili morfologiche associate a sedi extranodali:

- 1) Metastasi extralinfonodali

Dalla combinazione di alcune delle variabili sopra elencate, deriva il fattore prognostico più importante: lo stadio pTNM .

La stadiazione del carcinoma colo-rettale secondo il sistema TNM è universalmente accettata per stimare la prognosi, definire la terapia più adatta e valutare i risultati. Consente una descrizione dell'estensione della malattia neoplastica ricorrendo a tre parametri:

- l'estensione del tumore primario (fattore T);
- l'estensione del coinvolgimento linfonodale (fattore N);
- le metastasi a distanza (fattore M).

La sopravvivenza globale a 5 anni è del 60-65% ed è significativamente condizionata dallo stadio.

4. PREMESSE E SCOPO DEL LAVORO

Nell'Ottobre 2002, si è costituito a Padova un gruppo interdisciplinare di lavoro che ha come tema il carcinoma colo-rettale. A partire da tale data, la diagnostica anatomico-patologica post-operatoria di tutti i casi di CCR sottoposti ad intervento chirurgico radicale afferiscono alla U.O. di Anatomia Patologica Generale. I dati clinico-patologici concernenti i pazienti sono stati collezionati in modo prospettico e standardizzato.

Obiettivo di questo studio è contribuire alla caratterizzazione del CCR individuando parametri isto-patologici predittivi di comportamento clinico.

A tale scopo, e per meglio individuare e verificare l'importanza prognostica di alcune variabili, tale indagine è stata condotta su tre gruppi:

A) 1065 pazienti con CCR di cui sono stati ottenuti i dati di *follow-up*.

Di questo gruppo sono state cercate correlazioni tra le variabili clinico-patologiche e tra queste e gli eventi "ricorrenza di malattia" (DFS: *disease free survival*; intesa sia come recidiva locale, sia come metastasi a distanza) e "morte per malattia" (OS: *overall survival*).

B) 944 pazienti con CCR pNOM0 (estratti dal gruppo A).

Come dimostrato dalla letteratura, il 20-30% dei pazienti con CCR pNOM0 (stadi 0, II, II; *i.e.* senza diffusione linfonodale o a distanza) va incontro a recidiva di malattia entro 5 anni. Obiettivo della selezione e studio di questo sottogruppo di pazienti è quello di individuare eventuali variabili (morfologiche e/o legate alla procedura chirurgica e/o anatomopatologica di "recovery" linfonodale) associate a rischio di ricorrenza e pertanto in grado di spiegare, almeno in parte, la percentuale di recidive che occorrono in questa coorte di soggetti con malattia limitata al viscere.

C) 361 pazienti con CCR pNOM0 (estratti dal gruppo B in modo consecutivo)

di cui è stata indagata la presenza di Cellule Tumorali Isolate (ITC) nei linfonodi regionali al fine di stabilire il valore di questo parametro biologico nel fornire indicazioni prognostiche aggiuntive.

Le ITC sono definite come cellule singole o piccoli *clusters* di cellule tumorali di dimensioni inferiori a 0,02 cm e rilevabili solo con metodica immunoistochimica o molecolare. A differenza delle metastasi (dimensioni > 0,2 cm) e delle micrometastasi (dimensioni comprese tra 0,02 cm e 0.2 cm), le ITC non partecipano alla definizione dello stadio ma vengono riportate come pNO (i+) o pNO (mol+) a seconda delle metodica con cui vengono identificate (1).

5. REVISIONE DELLA LETTERATURA

5.1 CCR E VARIABILI DEMOGRAFICHE

5.1.1 CCR ED ETÀ

In un lavoro del 2003, Chiang *et al.* (2) hanno studiato una popolazione di 5436 pazienti operati per CCR sporadico allo scopo di individuare un gruppo di età con distinte caratteristiche clinico-patologiche. La proporzione di tumori localizzati (Dukes' A e B) aumentava significativamente con l'età, dal 31,3% del gruppo più giovane al 49% del gruppo più anziano. La proporzione dei tumori scarsamente differenziati diminuiva all'aumentare dell'età, dal 16,9% nel gruppo con ≤ 30 anni al 6,2% nel gruppo ≥ 81 anni. Lo stesso andamento era osservato nella proporzione di tumori mucinosi (36,1% nel gruppo più giovane vs 7,5% nel gruppo più anziano). Nessuna differenza era presente nella distribuzione dei gruppi di età rispetto alla sede del tumore.

Fante *et al.* (3) hanno studiato le caratteristiche cliniche di 168 soggetti con CCR di età inferiore a 55 anni appartenenti ad un registro di popolazione che nel periodo 1984-1992 contava un totale di 1298 casi. Questi pazienti (12,9% del totale) sono stati stratificati in 3 gruppi: 1) <40 anni, 2) 41-50 anni e 3) 51-55 anni. La loro distribuzione (rispetto ai casi totali) era: 14 pazienti (1,1%) con <40 anni, 76 (5,9%) con 41-50 anni e 78 (6,0%) con 51-55 anni. In tutti i gruppi, il CCR era localizzato prevalentemente in sede distale con una tendenza non significativa ad una preferenziale localizzazione destra per i tumori del gruppo I. Non c'erano differenze tra i gruppi rispetto alla distribuzione di stadio e istotipo.

5.1.2 CCR:ETÀ E SESSO

Arai *et al.* (9) hanno condotto uno studio retrospettivo di 947 pazienti consecutivi di età \geq 65 anni per studiarne le caratteristiche patologiche. I pazienti sono stati suddivisi in: 1) 65-74 anni (352 casi), 2) 75-84 anni (352 casi) e 3) $>$ 85 anni (140). Nel gruppo 3, il rapporto M:F era 1:1,8; tuttavia, il rischio relativo di CCR nei maschi era maggiore rispetto quello delle femmine nei tre gruppi di età. Tra i soggetti del gruppo 3 ($>$ 85 anni), il 52% dei casi con localizzazione prossimale della neoplasia erano di sesso femminile e tale percentuale era significativamente maggiore rispetto a quella degli altri gruppi. La proporzione di carcinomi scarsamente differenziati e mucinosi era maggiore nei pazienti $>$ 85 anni. I risultati indicano che, all'aumentare dell'età, aumenta la proporzione di CCR che si localizzano a destra e che hanno istotipo poco differenziato.

Fazeli *et al.* (10) hanno esaminato la distribuzione per sesso ed età di 403 casi di CCR, indagando possibili correlazioni con la sede, il grado di differenziazione e lo stadio della neoplasia. Maschi e femmine costituivano il 52,4% e il 47,6% dei casi, rispettivamente. I pazienti sono stati suddivisi in due gruppi di età: \leq 40 anni (101 casi) e $>$ 40 anni (302 casi). Nei due gruppi, la distribuzione del tumore per sede era sovrapponibile \leq 40 anni: 18,5% prossimale, 81,5% distale; $>$ 40 anni: 15,7% prossimale, 84,3% distale). Tra i pazienti con \leq 40 anni, la maggior parte era in stadio III. Tra i pazienti con $>$ 40 anni, la maggior parte era in stadio II. Tra i due gruppi, quello con \leq 40 anni aveva una maggior percentuale di neoplasie poco differenziate (22% vs 5,9%) e una minore proporzione di neoplasie bene differenziate (24,4% vs 41,5%) rispetto all'altro gruppo. Tra i due sessi, non c'erano differenze nella distribuzione dello stadio e del grado tumorale.

Kim *et al.* (11) hanno studiato una popolazione di 4987 CCR ottenuti dal registro tumori di Seoul tra il 1993 e il 1995. Nei maschi, l'incidenza (aggiustata per età) dei CCR distali era maggiore rispetto a quella dei CCR prossimali (4,7/100.000 vs 3,5/100.000). Tale differenza non era osservata nelle donne. L'incidenza del rapporto M:F (aggiustato per età) aumentava da 1,2 (nel colon destro) a 1,6 (nel colon sinistro). Nelle donne, l'incidenza del rapporto colon destro/colon sinistro era >1 dopo i 60 anni; nei maschi, al contrario, questo rapporto era >1 prima dei 50 anni.

5.2 CCR E VARIABILI CLINICO-PATOLOGICHE

5.2.1 CCR: SEDE E STADIO

Nawa *et al.* (12) hanno considerato un gruppo di 3552 CCR consecutivi per investigare la presenza di differenze cliniche tra neoplasie prossimali e distali. La maggior parte (52%) delle neoplasie prossimali erano distribuite tra soggetti di sesso femminile; al contrario, la maggior parte (61%) dei tumori distali erano distribuiti tra soggetti maschi. L'età dei pazienti con CCR prossimale era maggiore di quella dei soggetti con neoplasia distale (69,7 vs 66,6). La proporzione di CCR localizzati a destra era maggiore in pazienti di età inferiore a 40 e superiore a 70 anni rispetto ai gruppi di età intermedia.

Erkek *et al.* (13) hanno condotto uno studio retrospettivo su 1771 pazienti (59,2% maschi, 40,8% femmine) con diagnosi di CCR nel periodo 1985-2001 cercando possibili variazioni nella distribuzione topografica del CCR nel tempo rispetto a sesso ed età dei pazienti. La maggior parte dei CCR (67%) era situato in regione sigmoide-rettale. La maggior parte dei pazienti (66%) aveva più di 51 anni. Nessuna variazione nella

distribuzione dei CCR per età e sesso si era verificata nel tempo. Tali dati non supportano un progressivo *shift* prossimale nella distribuzione del CCR.

Ponz de Leon *et al.* (14) hanno esaminato i 2462 CCR presenti nel registro tumori di Modena nel periodo 1984-1998. Nei 15 anni considerati, gli autori hanno valutato l'incidenza del CCR, la sua distribuzione topografica e lo stadio. Nel colon prossimale e in quello distale (complessivamente considerati), l'incidenza è aumentata del 33,7%. Al contrario, l'incidenza del carcinoma rettale è scesa dal 40% al 26%. Lo stadio ha mostrato un graduale aumento delle lesioni localizzate in tutte le sedi (*i.e.* stadi I/II) (41,2% nel 1984 vs 53,3% nel 1998). Le conclusioni dello studio sono state che, più che uno "*shift*" prossimale del CCR, si è verificato un aumento nella incidenza del CCR in tutti i segmenti colici.

Sarli *et al.* (15) hanno valutato le variazioni di incidenza per sede di 5989 CCR nel periodo 1978-1999 concludendo che: 1) complessivamente, l'incidenza del CCR è significativamente aumentata per i tumori prossimali e diminuita per quelli rettali ("*shift* prossimale"); 2) l'incidenza dei CCR prossimali è aumentata soprattutto nelle donne, quella delle neoplasie distali soprattutto nei maschi; 3) la frequenza dei CCR prossimali aumenta con l'età.

Mostafa *et al.* (4) , in uno studio demografico di 1355 soggetti, hanno documentato una "migrazione prossimale" del CCR nel periodo 1997-2000 rispetto a quello 1987-1996. Inoltre, nella intera coorte, il CCR prossimale era più frequente nei soggetti di sesso femminile e in pazienti >70 anni.

Gonzales *et al.* (16), in un lavoro che considerava 9550 pazienti con CCR, hanno dimostrato che la proporzione di CCR che si localizzano a destra aumenta all'aumentare dell'età ed è più frequentemente costituita da donne. Inoltre, i tumori prossimali sono più spesso diagnosticati in stadi avanzati (III/IV).

In uno studio prospettico di Alley *et al.* (17) comprendente 402 pazienti con CCR, 133 avevano un tumore localizzato a destra. In questo gruppo, non c'erano significative differenze tra i due sessi. Rispetto ai CCR distali, quelli prossimali erano più frequentemente in stadio più avanzato. Infine, nel gruppo con CCR destro, i pazienti >70 anni erano costituiti prevalentemente da donne.

Gomez *et al.* (18) hanno analizzato la distribuzione topografica del CCR nel periodo 1993-2002 in una popolazione di 763 pazienti operati per CCR per valutare l'eventuale migrazione prossimale del tumore documentata da alcuni studi. Il 70% delle neoplasie era localizzato a sinistra. La distribuzione anatomica del CCR è rimasta stabile e non c'erano associazioni significative tra sede del tumore e età/sexo dei pazienti.

Keating *et al.* (19) hanno descritto le caratteristiche epidemiologiche del CCR di 2272 casi. Rispetto alla topografia, la distribuzione dei casi era: 1/3 in sede prossimale, 1/3 in sede distale e 1/3 al retto. Rispetto allo stadio, i cancri erano: 14% Dukes' A, 43% Dukes'B e 43% Dukes'C. Lo stadio Dukes' A era più frequente nei tumori rettali. Il rapporto M:F era 1,6:1 (nei tumori rettali) e 0,9:1 (nei tumori colici). La proporzione delle neoplasie prossimali aumentava con l'età in entrambi i sessi. Tra i tumori prossimali, la percentuale di neoplasie poco differenziate era maggiore rispetto a quella dei cancri distali. Infine, lo stadio e il grado del CCR erano significativamente associati.

Mitry *et al.* (20) hanno confrontato la distribuzione per stadio rispetto all'età di una popolazione di 4643 casi di CCR diagnosticati tra il 1976 e il 1996. I pazienti sono stati suddivisi in: <45 anni (146 casi) e ≥45 anni (4497 casi). Nel gruppo ≥45 anni, lo stadio II era il più frequente (31,9%). Nel gruppo <45 anni, il più frequente era lo stadio III (30,8%). La proporzione dei tumori prossimali era maggiore nei pazienti più anziani rispetto a quelli più giovani. La proporzione di tumori mucinosi non era significativamente diversa tra i due gruppi (4,8% <45 anni vs 2,3% ≥45 anni).

Green *et al.* (21) hanno analizzato l'andamento nel tempo (1995-2003) della distribuzione per stadio e sesso di 12761 CCR. Per tutto il periodo considerato, l'incidenza (aggiustata per età) del CCR si è mantenuta maggiore nel sesso maschile e la distribuzione dei CCR per stadio è rimasta stabile con: Dukes' A 8%, Dukes' B 30%, Dukes' C 27% e Dukes'D 17%.

5.2.2 CCR: ISTOTIPO E GRADING

Linares Santiago *et al.* (22) hanno indagato prospetticamente 215 CCR diagnosticati nel periodo 1997-2000. Lo studio era principalmente focalizzato sull'obiettivo di evidenziare relazioni tra il grado di differenziazione e la sede della neoplasia, lo stadio, il sesso e l'età. Nessuna correlazione è stata trovata tra *grading* del CCR e i parametri sopracitati.

Gervaz *et al.* (23), indagando 126 CCR, hanno dimostrato che le neoplasie mucinose e scarsamente differenziate sono più frequentemente localizzate a destra (44% e 23% rispettivamente) che in sede distale (21% e 6% rispettivamente).

In modo analogo, anche Iwatani *et al.* (24) hanno dimostrato la preferenziale localizzazione destra dei CCR ad istotipo mucinoso.

5.2.3 CCR SINCRONI E METACRONI

Fukatzu *et al.* (25) hanno esaminato 249 CCR (8%) sincroni di una serie consecutiva di 3061 pazienti. L'analisi multivariata dei fattori di rischio per CCR sincroni in base alla sede ha rivelato che: 1) il sesso maschile è un fattore di rischio per i CCR sincroni sinistri; 2) l'età è un fattore di rischio sia per i CCR sincroni prossimali sia per quelli che si localizzano a destra e a sinistra; 3) CCR sincroni prossimali tendono ad associarsi ad adenomi prossimali, CCR sincroni distali ad adenomi distali.

Nel lavoro di Andreoni *et al.* (26) sulla valutazione dell'*outcome* a lungo termine di 902 CCR consecutivi raccolti nel periodo 1994-2003, la casistica comprendeva 12 CCR sincroni (1%) ma non viene riportata la loro distribuzione per sede, sesso ed età.

Tra i 1522 pazienti dello studio di Piñol *et al.* (27), l'1,7% (27 casi) aveva CCR sincroni, il 27% (411 casi) aveva adenomi e il 4,4% (67 casi) aveva entrambi. L'analisi multivariata ha dimostrato che la presenza di neoplasie colorettrali sincrone in pazienti con CCR era indipendentemente associata con: sesso maschile (OR=1,94), localizzazione prossimale (OR=1,4), pTNM II (OR=1,31) e istotipo mucinoso (OR=1,89) del tumore primario.

Nella casistica di 166 pazienti con CCR di Langevin *et al.* (28), 8 casi (5%) avevano neoplasie sincrone. Inoltre, polipi neoplastici benigni erano presenti nel 28% dei pazienti con CCR singoli e nel 38% di quelli con CCR sincroni.

Il gruppo di 249 pazienti con CCR considerati da Schaal *et al.* (29) comprendeva 12 casi (4,8%) con CCR sincroni. L'età media dei soggetti con più di una neoplasia era maggiore di quelli con neoplasia isolata (69 vs 63 anni). Nei 2/3 dei casi, i tumori sincroni erano situati nel sigma; in 1/3 dei casi, in segmenti colici non adiacenti. Nel 50% dei casi, i CCR sincroni erano associati ad adenomi.

In 876 pazienti operati per CCR, Oya *et al.* (30) hanno identificato 42 casi (4,8%) con due o più tumori sincroni. In 29 casi, i tumori sincroni erano presenti nello stesso segmento o in segmenti colici adiacenti; nei rimanenti 11, le lesioni erano in segmenti colici separati. Rispetto ai CCR singoli, quelli sincroni avevano dimensioni significativamente più piccole, erano localizzati più frequentemente a sinistra ed avevano più spesso valori di pT inferiori. Il rapporto M:F era maggiore nei casi sincroni rispetto a quelli singoli. Nei CCR sincroni, le metastasi a distanza erano più frequenti rispetto ai singoli. Le neoplasie principali dei casi sincroni erano simili a quelle dei casi singoli per dimensioni, grado di differenziazione, sede, stadio e invasione vascolare. Anche l'età dei due gruppi era sovrapponibile. Infine, l'incidenza di tumori metacroni (≥ 1 anno dall'intervento) non differiva tra i casi sincroni e singoli.

Wang *et al.* (31) hanno studiato le caratteristiche dei CCR sincroni e metacroni presenti in una casistica di 1348 pazienti. I CCR sincroni erano 15 (1,1%) e i CCR metacroni 22 (1,6%). I due gruppi non differivano tra loro per età (media 47-48 anni),

nesso (maschi 73%, femmine 27%) e sede. Il 55% dei CCR metacroni è stato diagnosticato entro 3 anni dall'intervento, e il 41% dopo 8 anni.

La popolazione di 1780 CCR studiata da Chen *et al.* (32) comprendeva 52 casi (3%) con CCR sincroni e 13 casi (1%) con CCR metacroni. Rispetto ai CCR singoli, quelli sincroni erano caratterizzati un più alto grado di differenziazione ed una più frequente associazione con adenomi (35% vs 15%) (tabella 6). Nel gruppo dei sincroni: 1) i tumori associati ai CCR principali erano più spesso prossimali ed in stadio più precoce rispetto ai CCR singoli; 2) la distribuzione per sede dei CCR principali non differiva in modo significativo da quella dei CCR singoli. Nel gruppo dei metacroni, il primo tumore era più spesso localizzato a destra rispetto ai singoli mentre non vi erano differenze rispetto allo stadio.

Ikeda *et al.* (33) hanno analizzato la distribuzione topografica di 120 (6,6%) carcinomi colici multipli (sincroni e metacroni) che facevano parte di una popolazione di 1812 CCR. I sincroni erano 75 (4%), i metacroni 36 (2%). La maggior parte dei CCR sincroni si localizzava a sinistra (80%). Nel gruppo dei metacroni, la maggior parte dei secondi tumori era situato a destra (65%), la maggior parte dei primi a sinistra (66,7%).

Nella casistica di 101 CCR di Welch *et al.* (34), il 2% dei pazienti aveva tumori metacroni e l'1,7% tumori sincroni. L'intervallo medio tra i CCR metacroni era di 9 anni. L'età dei pazienti con CCR sincroni era maggiore di quelli con CCR singolo o lesioni metacrone. I CCR sincroni erano più frequentemente localizzati a destra rispetto a quelli singoli.

Gervaz *et al.* (35) hanno valutato il rischio di sviluppare un CCR metacrono in una popolazione non selezionata di 5006 CCR sporadici dimostrando che: 1) i soggetti con un primo tumore localizzato a destra hanno un rischio doppio di sviluppare un CCR metacrono rispetto a quelli con neoplasia distale (3,4% vs 1,8%); 2) la maggior parte delle seconde neoplasie si localizza al colon destro.

Nello studio di Park *et al.* (36), 5447 CCR comprendevano 39 pazienti (0,7%) con CCR metacroni. L'intervallo medio di tempo tra il primo e il secondo cancro era di 39 mesi. Rispetto ai pazienti con unica neoplasia, i quelli con CCR metacroni: 1) l'età media era inferiore (53 vs 58 anni) e il rapporto M:F era maggiore; 2) il primo tumore era localizzato più frequentemente a destra; 3) l'incidenza di polipi e/o CCR associati alla prima neoplasia era maggiore rispetto al gruppo di CCR singoli.

Anche i lavori di Ballesté *et al.* (37) e Yamzaki *et al.* (38) hanno dimostrato che la presenza di adenomi sincroni (o precedenti) alla prima neoplasia è una variabile indipendentemente associata allo sviluppo di tumori metacroni.

I lavori di Oya *et al.* (30), Park *et al.* (36) e Cali *et al.* (39) hanno dimostrato che i CCR metacroni sono diagnosticati in stadi più precoci rispetto alla prima neoplasia.

5.2.4 CCR E ADENOMI SINCRONI

Nel lavoro di Mattar *et al.* (40), 188 (33%) su 569 pazienti operati per CCR aveva adenomi sincroni. La loro presenza è stata associata ad un miglior *outcome* rispetto ai soggetti senza adenomi.

Slater *et al.* (41) hanno indagato la relazione tra sede del CCR e presenza di adenomi sincroni. Su 591 pazienti, il 30% di questi aveva adenomi. La maggior parte dei casi con adenomi erano associati ad una localizzazione prossimale del tumore. Il 47% e il 22% dei CCR prossimali e distali, rispettivamente, aveva adenomi nel segmento colico asportato. Inoltre, il rapporto M:F e l'età erano maggiori nei soggetti con adenomi sincroni rispetto a quelli con solo CCR.

5.2.5 CCR: LINFONODI E METASTASI LINFONODALI

Hernanz *et al.* (42) hanno studiato 193 casi di CCR per determinare il numero minimo di linfonodi da esaminare per un'adeguata valutazione dello status linfonodale (N+ vs N-). Tale numero è risultato 6. Il numero medio di linfonodi identificati per caso era 11.

I risultati del lavoro di Tsai *et al.* (43) hanno suggerito che un numero minimo di 18 linfonodi deve essere esaminato per una accurata stadiazione dei CCR pN0. Il gruppo di studio aveva considerato 180 pazienti pT(2-4)N0M0. Erano stati esclusi i pazienti che avevano ricevuto terapia neo-adiuvante. Il numero medio di linfonodi analizzati per caso era 12.

Nel loro studio di 151 casi di CCR, Kim *et al.* (44) hanno concluso che: 1) all'aumentare del numero di linfonodi esaminati, aumenta la percentuale di metastasi linfonodali e la incidenza dei casi N+ è significativamente maggiore quando sono esaminati ≥ 10 linfonodi; 2) sia il grado di differenziazione che il pT correlano con un maggior numero di metastasi linfonodali. Complessivamente, il numero medio di

linfonodi esaminati per caso era 12,8; quello dei casi sottoposti a terapia neo-adiuvante era 10,3.

In uno studio di popolazione di circa 82.000 pazienti operati per CCR nel periodo 1988-2000, Chen *et al.* (45) hanno dimostrato che: 1) il numero dei linfonodi metastatici (in particolare lo stadio pN2) aumenta all'aumentare dei linfonodi campionati; 2) il numero dei linfonodi isolati è maggiore nel colon prossimale; 3) all'aumentare del numero dei linfonodi isolati, aumenta la percentuale dei pazienti in stadio III e diminuisce quella dei pazienti in stadio I. La sopravvivenza era migliore nei pazienti con ≥ 15 linfonodi. Nel tempo, la percentuale di casi con ≥ 15 linfonodi esaminati era aumentata dal 24,3% (1998-1991) al 28,9% (1996-2000). La mediana di linfonodi isolati per paziente era 9.

Sarli *et al.* (46) hanno paragonato 625 casi di CCR in stadio II con 415 casi di CCR in stadio III. Per i CCR in stadio II, il numero dei linfonodi diminuisce all'aumentare dell'età ed è maggiore nei soggetti di sesso femminile, nei tumori moderatamente/scarsamente differenziati, mucinosi e situati a destra; il numero di linfonodi esaminati nei casi in stadio III era influenzato solo da sede e *grading* della neoplasia. Nei casi in stadio III, c'era una significativa correlazione tra il numero dei linfonodi positivi e il numero dei linfonodi esaminati. La sopravvivenza a 5 anni dei pazienti in stadio II con ≤ 9 linfonodi (51%) era simile a quella dei pazienti in stadio III con ≤ 3 linfonodi (53%). Questi risultati dimostrano che la prognosi dei pazienti con CCR in stadio II dipende dal numero dei linfonodi esaminati.

Anche il lavoro su 202 CCR (94 stadio II, 108 stadio III) di Yoshimatsu *et al.* (47) ha individuato in 9 linfonodi il numero minimo associato ad una migliore sopravvivenza tra i pazienti con CCR in stadio II. I casi in stadio II con < 9 linfonodi

avevano un *outcome* simile a quello dei soggetti in stadio III. Il numero medio di linfonodi esaminati per caso era 19 (stadio II) e 18,4 (stadio III).

Allo stesso modo, anche lo studio di Cianchi *et al.* (48) su 140 casi di CCR in stadio II ha concluso che un minimo di 9 linfonodi è sufficiente per una corretta stadiazione dei CCR pN0 e che la sopravvivenza dei soggetti in stadio II con <9 linfonodi era simile a quella dei casi in stadio III. Il numero mediano di linfonodi esaminati per caso era 12.

Johnson *et al.* (49) hanno dimostrato che, anche nei pazienti con CCR in stadio IIIB/C, la sopravvivenza era significativamente associata al numero dei linfonodi negativi.

Baxter *et al.* (50) hanno valutato le caratteristiche clinico-patologiche di un'ampia popolazione di circa 117.000 pazienti operati per CCR con particolare riferimento alla adeguatezza della linfadenectomia (*i.e.* ≥ 12 linfonodi). La popolazione era così costituita: M:F=1:1, 42% sede prossimale, 43% sede distale, 15% sede rettale. La mediana dei linfonodi esaminati per caso era 9. Il numero dei linfonodi esaminati differiva in base a: 1) sede (maggiore nei CCR prossimali [mediana 11, media 13] rispetto a quelli distali [mediana 7, media 9] e rettali [mediana 8 media 9,5]) (tabella 9); 2) stadio (meno linfonodi erano esaminati nei pazienti in stadio I [mediana 6, media 8,4] rispetto a quelli in stadio II [mediana 10, media 11,6] e III [mediana 11, media 12,7]). Il 37% dei pazienti avevano ricevuto una adeguata linfadenectomia. L'analisi multivariata ha dimostrato che i fattori che influenzano una linfadenectomia adeguata erano: età ≤ 50 anni, stadio II/III, sede prossimale e scarso grado di differenziazione.

Caplin *et al.* (51) hanno individuato in 7 linfonodi il numero minimo associato ad una migliore sopravvivenza tra i pazienti con CCR in stadio II. Inoltre, il numero di linfonodi isolati dal colon prossimale era significativamente maggiore di quello dei linfonodi isolati dal colon distale.

Prandi *et al.* (52) hanno indagato, in un gruppo di 3648 pazienti operati per CCR, la esistenza di una associazione tra estensione della linfadenectomia e *outcome*. Tra i risultati ottenuti, la sede (prossimale) e l'età (<65 anni) erano variabili associate ad un maggior numero di linfonodi esaminati. *Grading* (G3) e sesso (femminile) mostravano correlazione col numero dei linfonodi positivi ma non con quello totale dei linfonodi isolati. Il numero dei linfonodi positivi non correleva col numero totale dei linfonodi isolati. Infine, nel gruppo dei pazienti in stadio II, quelli con <7 linfonodi avevano una minore sopravvivenza rispetto a quelli con ≥ 7 linfonodi.

Berberoglu *et al.* (53) hanno definito un valore di *cut-off* per il numero minimo di linfonodi da esaminare per una accurata stadiazione dei CCR pN0. Il numero mediano di linfonodi isolati per caso da 301 pazienti con CCR è stato 10. C'era una differenza significativa tra il numero di linfonodi isolati in soggetti con CCR distale e prossimale (11 vs 17). L'analisi univariata ha dimostrato che pazienti con tumori ben differenziati, localizzati a destra, con pT1-2 e con >11 linfonodi avevano una sopravvivenza migliore rispetto alle loro controparti. In analisi di regressione multipla, le stesse variabili (ad eccezione della sede) correlevano indipendentemente con la prognosi ed il numero dei linfonodi era il fattore con la maggiore significatività statistica.

Swanson *et al.* (54) hanno esaminato l'*outcome* di circa 35.000 casi di CCR pT3N0 concludendo che: 1) la sopravvivenza è strettamente correlata al numero dei

linfonodi esaminati e 2) almeno 13 linfonodi devono essere esaminati per stadiare correttamente un CCR pT3 come pN0. Il numero mediano dei linfonodi esaminati per caso era 9.

Nel lavoro di Wong *et al.* (55), l'analisi di 196 pazienti con CCR in stadio pT2-3 ha concluso che il numero minimo di linfonodi da esaminare per una adeguata valutazione dello status linfonodale è 14. In questo lavoro, il numero medio di linfonodi isolati era 17. I soggetti con metastasi linfonodali avevano un numero maggiore di linfonodi esaminati rispetto a quelli senza metastasi (20 vs 14).

Lo stesso valore (14 linfonodi) è stato ricavato da Tepper *et al.* (56) che hanno considerato 1664 pazienti operati per CCR (527 N+ e 1137 N-). In questo lavoro, lo status linfonodale si associava significativamente a grado/stadio del tumore e presenza di invasione neoplastica vascolare. Come nel lavoro di Wong, il numero medio di linfonodi esaminati nei pazienti N- era inferiore a quello esaminato nei pazienti N+ (10,1 vs 11,3).

Goldstein *et al.* (57), in base ai loro dati, hanno fornito il 17 come valore di *cut-off* avendo osservato che l'87% dei 750 pazienti pT3 con metastasi linfonodali da CCR avevano un numero totale di linfonodi compreso tra 17 e 20. Il numero medio e mediano dei linfonodi esaminati per caso era 9,8 e 8, rispettivamente. Il 70% dei soggetti aveva da 1 a 12 linfonodi, il 13% da 13 a 16 e il 14% ≥ 17 linfonodi.

Le Voyer *et al.* (58) hanno esaminato 3411 soggetti operati per CCR di cui 648 senza (N-) e 2763 con (N+) metastasi linfonodali. Media e mediana dei linfonodi esaminati era simile tra i due gruppi (13 e 11 linfonodi, rispettivamente). Nella analisi di

regressione multivariata, le variabili significativamente associate alla sopravvivenza erano 1) per il gruppo N+: età, pT, grado, numero dei linfonodi positivi e numero totale dei linfonodi esaminati; 2) per il gruppo N-: età e numero totale dei linfonodi. Il numero minimo di linfonodi da esaminare individuato dallo studio è stato 20.

Cserni *et al.* (59) hanno determinato un numero minimo (n=7) e un numero ottimale (n=16) di linfonodi per un adeguata valutazione dello *status* linfonodale. La casistica era un gruppo di 224 pazienti (di cui 101 N- e 123 N+) collezionati dal 1996 al 1998. Il numero medio di linfonodi isolati per caso era aumentato durante il periodo di studio (media 8,9). La distribuzione dei casi in base al numero dei linfonodi isolati è mostrato in figura 8. Il figura 9 mostra la relazione tra il numero dei linfonodi isolati e lo *status* linfonodale (N+/N-): l'esame di ≥ 7 linfonodi aumenta la differenza tra il numero dei casi N+ ed N- (a favore dei primi) migliorando la accuratezza dello *staging*.

Ancora Cserni *et al.* (60) hanno dimostrato che la maggior parte dei linfonodi regionali con metastasi da CCR sono localizzati nelle vicinanze del tumore ($i.e. \leq 3$ cm) ed, in base a questo, suggeriscono un approccio qualitativo, anziché quantitativo, per ridurre il numero ottimale di linfonodi da esaminare per un adeguato *staging* linfonodale.

Per stabilire il numero minimo di linfonodi da esaminare per classificare correttamente un tumore come pN0, Maurel *et al.* (61) hanno testato la correlazione tra il numero di linfonodi esaminati e lo status linfonodale (*i.e.* N+ vs N-) di 1081 casi di CCR. La media dei linfonodi esaminati per caso era 7,7. La dicotomizzazione (N+/N-) dei casi in base al numero dei linfonodi esaminati per paziente (tabella 10) ha mostrato che la proporzione dei tumori classificati come pN+ aumenta in modo

significativo all'aumentare del numero dei linfonodi esaminati. La probabilità di valutare correttamente lo *status* linfonodale (OR) aumenta con il numero dei linfonodi e si avvicina a 1 quando questo numero è ≥ 8 .

Horzic *et al.* (62) hanno studiato 177 pazienti (106 maschi e 71 femmine) operati per CCR per determinare da quali fattori dipende il numero di linfonodi esaminati. La lunghezza del colon asportato, la dimensione, il *grading* del CCR e la taglia del più grande dei linfonodi isolati correlavano significativamente con il numero dei linfonodi esaminati. Al contrario, età/ sesso dei pazienti e sede (prossimale vs distale)/istotipo (mucinoso vs non-mucinoso) della neoplasia non si sono dimostrati significativamente associati al numero linfonodale. In una analisi di regressione multipla, la dimensione della neoplasia, il miglior grado di differenziazione tumorale e il sesso maschile sono risultati fattori indipendentemente associati ad un maggior numero di linfonodi esaminati.

Ostadi *et al.* (63) hanno analizzato i fattori che influenzano il recupero dei linfonodi dai colon asportati per CCR di 264 pazienti. Di questi, 70 (26,5%) aveva meno di 12 linfonodi. Il numero medio di linfonodi esaminati per caso era 18,1. Tra le variabili esaminate (che includevano età/sesso dei pazienti, stadio del tumore, tipo di procedura chirurgica, terapia neoadiuvante, operatore chirurgo e patologo), il fattore che maggiormente influiva sulla variabilità numerica dei linfonodi esaminati era legato all'operatore patologo. Il numero medio di linfonodi isolati da differenti patologi variava da 12,6 a 29,7. Anche le percentuali dei casi con meno di 12 linfonodi si distribuivano diversamente a seconda dell'operatore.

Tra le variabili analizzate da Gelos *et al.* (64) su una casistica di 341 CCR, quelle che influivano sul numero dei linfonodi esaminati erano: pT1 (associato ad un minor numero di linfonodi rispetto ad infiltrazioni parietali più profonde), la sede prossimale e la lunghezza del colon (associati ad un maggior numero di linfonodi). Non c'era, invece, associazione tra il numero dei linfonodi esaminati e l'incidenza di metastasi linfonodali. Il numero mediano di linfonodi esaminati per caso è stato 15,1.

Anche Johnson *et al.* (65) hanno analizzato una coorte consecutiva di 569 CCR per identificare i fattori associati ad una adeguata valutazione linfonodale. La media dei linfonodi esaminati per caso era 8,3; la mediana 7. Solo il 22,4% dei pazienti aveva ≥ 12 linfonodi. In media, i pazienti N+ avevano più linfonodi di quelli N- (9,5 vs 8,2). C'era una forte associazione tra il numero dei linfonodi isolati e la presenza di metastasi linfonodali (tabella 12). Le variabili risultate positivamente correlate al numero linfonodale sono state: 1) la sede prossimale del tumore, 2) la lunghezza del colon, 3) l'elevata esperienza del centro chirurgico, 4) l'esame macroscopico da parte di patologi (vs residenti/tecnici). Nessuna associazione era presente tra numero di linfonodi e taglia/*grading* del cancro. Infine, non c'erano differenze nel numero medio di linfonodi tra pazienti con cancro rettale sottoposti a terapia neo-adiuvante e pazienti con neoplasia distale (7 vs 7,2).

Baxter *et al.* (66) hanno esaminato una popolazione di circa 6500 pazienti operati per CCR di cui 1034 erano stati sottoposti a radioterapia neo-adiuvante (RT). Nonostante la media dei linfonodi esaminati fosse inferiore nei casi RT (7 vs 10), tale differenza non era significativa. Tuttavia, nel 16% dei casi RT (vs 7,5% senza RT) non erano stati identificati linfonodi ($p < 0,0001$). Solo il 20% dei casi RT avevano un minimo di 12 linfonodi.

Takano *et al.* (67) hanno identificato i fattori di rischio associati a metastasi linfonodali analizzando 2125 pazienti operati per CCR. In analisi univariata, sesso femminile, età (>50 anni), sede prossimale, pT3-4 e basso grado di differenziazione del tumore erano variabili significativamente associate a metastasi linfonodali. L'analisi multivariata ha rivelato che: 1) pT3-4 e 2) scarsa differenziazione tumorale erano fattori indipendentemente associati al rischio di metastasi linfonodali; 3) al contrario, la presenza di adenomi sincroni era una variabile associata ad un minor rischio di metastasi.

Un altro fattore correlato alle metastasi linfonodali è stato individuato da Chok *et al.* (68) nella presenza di invasione angio-linfatica.

5.2.6 CCR: ITC: FREQUENZA E IMPATTO PROGNOSTICO

In uno studio prospettico condotto su 309 pazienti con CCR pN0, Mescoli *et al.* (69) hanno identificato (con metodo immunohistochimico) la presenza di ITC nel 50,5% di questi casi, pari al 9,9% dei 5016 linfonodi esaminati. In analisi multivariata, lo stadio e la presenza di invasione vascolare si sono dimostrate le uniche variabili patologiche significativamente associate alla presenza di ITC. Il numero medio di linfonodi esaminati per paziente è stato 16,2.

Un lavoro analogo di Wasif *et al.* (70), successivo al precedente, ha ottenuto risultati identici per quanto riguarda la correlazione *status* di ITC *versus* stadio e angio-invasione, studiando una popolazione di 107 soggetti. Tuttavia, la prevalenza di casi positivi per ITC è stata del 23,4%.

Le *reviews* di Tsavellas *et al* (71), Feezor *et al* (72), Nicastrì *et al* (73) e Messerini *et al* (74) hanno complessivamente preso in considerazione 28 lavori pubblicati tra il 1989 e il 2006 (74-99).

Tutti sono stati condotti su coorti di pazienti con CCR in stadio I/II (pN0) per i quali la ricerca di ITC nei linfonodi regionali è stata eseguita con metodica immunistochemica.

Il numero di pazienti studiati è compreso tra 10 e 173. Il numero totale di linfonodi studiati per ITC è compreso tra 150 e 1808 con un numero medio di linfonodi per caso tra 4 e 24. La prevalenza di pazienti positivi per ITC è compresa tra il 4% e il 100%.

Solo 7 (80,84,85,89) dei 28 lavori hanno considerato un numero di casi ≥ 100 ; in questi, la percentuale di pazienti con ITC è compresa tra il 16% e il 39%. Di questi, solo 2 (89,96) hanno dimostrato una influenza delle ITC sulla sopravvivenza e/o ricorrenza di malattia.

Di tutti gli studi, solo 9 (77,82,83,87,89,91,96,97,99) hanno dimostrato un impatto prognostico delle ITC. Il numero dei pazienti analizzati è compreso tra 19 e 156, il numero totale di linfonodi esaminati varia da 358 a 1266, la prevalenza di casi con ITC è compresa tra il 19% e il 100% e quella dei linfonodi ITC+vi varia dal 6% al 25%.

Tra i lavori che hanno identificato nelle ITC un indicatore prognostico significativo, quello di Bukholm *et al* (96) è lo studio con casistica più numerosa. Gli Autori hanno identificato 59 pazienti (38%) con ITC (documentate con immunistochemica) in un gruppo di 156 CCR in stadio II. Il numero medio di

linfonodi per caso era 5,5. Nessuna associazione è stata documentata tra la presenza di ITC e le variabili istopatologiche considerate, tra cui invasione vascolare e pT.

Tra gli studi che non hanno dimostrato alcuna abilità delle ITC nell'identificare, tra pazienti con CCR pN0, un sottogruppo a più alto rischio di ricorrenza di malattia, quelli di Fisher *et al* (94) e di Messerini *et al* (74) sono i lavori con le più ampie casistiche.

Il primo (94) è stato condotto su 399 casi di CCR in stadio I/II; di questi, 241 erano carcinomi rettali e un loro eventuale trattamento neo-adiuvante non è stato dichiarato. ITC sono state identificate con immunoistochimica in 73/399 casi (18%). Il numero totale di linfonodi esaminati e il numero medio di linfonodi per caso non sono stati specificati.

Il secondo (74) ha valutato incidenza e valore prognostico delle ITC in una serie consecutiva di 395 pazienti con CCR pT3N0M0 (inclusione, tra i retti, di casi sottoposti a terapia neo-adiuvante: non specificata). Il numero totale di linfonodi esaminati e il numero medio di linfonodi per caso non sono stati specificati. 112 casi (28%) sono risultati positivi per ITC nei linfonodi regionali al tumore. Nessuna associazione è stata dimostrata tra *status* di ITC e i parametri clinico-patologici considerati (tra cui invasione vascolare e pT).

Anche lavori pubblicati successivamente alle *reviews* sopracitate e condotti su piccoli gruppi non hanno dimostrato un ruolo prognostico delle ITC:

Fleming *et al* (100) hanno studiato (con immunoistochimica) 774 linfonodi di 56 pazienti con solo carcinoma del retto in stadio I/II. La mediana di linfonodi esaminati per caso è stata 14. ITC sono state identificate in 15 linfonodi (2%) di 10 pazienti (18%).

Nessuna associazione è stata documentata tra status di ITC e ricorrenza di malattia. Eventuale terapia pre-chirurgica non è stata dichiarata.

Steinert *et al* (101) hanno confermato la assenza di correlazione tra ITC e *outcome* documentando una prevalenza di ITC del 46% in una coorte di 90 soggetti con CCR pN0.

Il più recente lavoro di Urribaena-Amezaga *et al* (102) ha ulteriormente dimostrato la assenza di impatto prognostico delle ITC in un gruppo di 85 pazienti con CCR in stadio I e II. La frequenza di ITC è risultata del 36,5% con un numero medio di linfonodi analizzati per caso di 11. È stata, invece, dimostrata una correlazione tra la presenza di ITC e il numero di linfonodi esaminati (gruppo ITC+: 15; gruppo ITC-: 8).

6. PAZIENTI E METODI

6.1 PAZIENTI

Tra ottobre 2002 e ottobre 2010, sono stati collezionati in modo consecutivo e prospettico i dati clinico-patologici di 3337 carcinomi colo-rettali resecati con intento curativo.

Per 1605 di questi, sono stati acquisiti i dati riguardanti il *follow-up* (inteso come “intervallo di tempo libero da malattia” [DFS] e “sopravvivenza” [OS]), sia attraverso la collaborazione delle cliniche chirurgiche di riferimento, sia telefonicamente, tramite personale specializzato ed autorizzato dai comitati etici locali (Azienda Ospedaliera e Istituto Oncologico Veneto [IOV]).

Questi pazienti hanno rappresentato il principale gruppo di studio (**gruppo A**): 942 uomini (58.65%) e 664 donne (41.34%) con una età media al momento dell'intervento di 67 anni (*range* 21-99 anni) e un tempo mediano di *follow-up* di 51 mesi (*range* 0-88 mesi). La tabella 1 mostra le caratteristiche demografiche e le variabili clinico-patologiche del gruppo di studio.

Dal gruppo A, sono stati estratti i CCR pN0 (944 casi) che hanno costituito il **gruppo B**.

Dal gruppo B, sono stati selezionati 361 casi consecutivi (**gruppo C**) per lo studio delle cellule tumorali isolate (ITC). Da questa coorte, sono stati esclusi i carcinomi rettali sottoposti a terapia neo-adiuvante che, in virtù della loro nota paucità linfonodale, avrebbero influenzato i risultati delle correlazioni tra *status* di ITC e numero di linfonodi isolati sui quali tale ricerca è stata condotta.

Questi esclusi (40 casi) sono stati studiati a parte, insieme ai carcinomi rettali non trattati prima dell'intervento per indagare se la terapia neo-adiuvante influisca su DFS e/o OS.

Per rendere omogeneo il gruppo di studio, sono stati esclusi:

- CCR insorto in IBD (16 casi),
- FAP (2 casi),
- HNPCC (3 casi),
- carcinomi squamosi della regione anale (1 caso),
- tumori neuroendocrini primitivi colo-rettali (16 casi),
- melanomi maligni primitivi colo-rettali (3 casi),
- linfomi maligni primitivi colo-rettali (7 casi).
- Leiomiosarcoma pleomorfo primitivo colo-rettale (1 caso)

TABELLA I CARATTERISTICHE DEMOGRAFICHE E CLINICO-PATOLOGICHE DELLA CORTE

	VARIABILI	NUMERO	%
Sesso	Maschi	942	59
	Femmine	664	41
	TOTALE	1606	100
Età	media 67.8-68.4		
Sede	Colon destro	549	34
	Colon sinistro	624	39
	Retto	415	26
	.	17	1
	TOTALE	1606	100
Istotipo	Adenocarcinoma NAS	1412	88
	Adenocarcinoma mucinoso	160	10
	Adenocarcinoma midollare	4	0.2
	.	30	1.8
	TOTALE	1606*	100
Grado	1	219	14
	2	976	61
	3	369	23
	.	41	2
	TOTALE	2109*	100
Numero Linfonodi	Media generale	16.1	
	Media senza neo-adiuvante	16.58	
	Media senza retti	17.15	
	Media retti	12.77	
	Media retti neo-adiuvante	10.98	
pT	0	25	1.5
	is	50	3
	1	119	7.5
	2	316	19.6
	3	918	57.1
	4	174	11
	.	2	0.01
	TOTALE	1606	100

pN	0	944	59
	1/2	645	40
	.	17	1
	TOTALE	1606	100
Stadio Patologico (UICC)	0	66	4.1
	I	365	23
	II	474	29.5
	III	492	30.6
	IV	184	11.4
	.	23	1.4
	TOTALE	1606	100
CCR singoli, sincroni, metacroni	Adenocarcinomi Singoli	1493	93
	Adenocarcinomi Sincroni	85	5.2
	Adenocarcinomi Metacroni	28	1.7
	Adenocarcinomi Sincroni & Metacroni	2	0.01
	TOTALE	1606	100
Adenomi Sincroni	No	1271	79-77
	Sí	335	21
	TOTALE	1606	100
Polipi Iperplastici Sincroni	No	1483	92.4
	Sí	123	7.6
	TOTALE	1606	100
Terapia neoadiuvante	No	1410	88
	Sí	196	12
	TOTALE	1606	100

6.2 METODI (GRUPPO A)

6.2.1 RACCOLTA DEI DATI CLINICO-PATOLOGICI

La diagnostica anatomico-patologica è stata resa omogenea attraverso la adozione di protocolli standardizzati, sia per quanto riguarda il campionamento del materiale chirurgico che la redazione del referto anatomico-patologico.

6.2.2 PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO DEL MATERIALE CHIRURGICO

La procedura di campionamento del pezzo operatorio è stata uniformata in modo da minimizzare le variazioni procedurali tra i patologi coinvolti nel campionamento del materiale operatorio. Dopo fissazione (formalina al 4% per 24 ore), il materiale operatorio è stato esaminato e campionato secondo il seguente protocollo:

- 1.** misura della lunghezza del segmento intestinale
- 2.** misura delle dimensioni della neoplasia
- 3.** misura della distanza della neoplasia dai margini delle exeresi
- 4.** numero, dimensioni e distanza dai margini di exeresi di eventuali lesioni polipoidi
- 5.** campionamento dei margini di exeresi
- 6.** campionamento multiplo della neoplasia
- 7.** campionamento delle eventuali lesioni polipoidi
- 8.** campionamento di parete colica in assenza di lesioni macroscopiche e, se presente, di appendice ciecale e valvola ileo-ciecale
- 9.** isolamento del fibroadiposo peri-intestinale (FAP) dalla parete colica separando quello isolato entro 3 cm (a) da quello isolato a distanza superiore a cm 3 dalla neoplasia (b)
- 10.** peso separato del FAP identificato come “a” e “b”

- 11.** riduzione del FAP con sezioni seriate dello spessore di cm 0,1 per isolarne i linfonodi (che sono stati pertanto suddivisi in LNF isolati a distanza compresa entro cm 3 e superiore a cm 3 dalla neoplasia).

Dai campioni di tessuto sono stati allestiti preparati istologici con tecnica di *routine*.

6.2.3 LA REDAZIONE DEL REFERTO ANATOMO-PATOLOGICO

Il referto anatomico-patologico è stato ri-organizzato al fine di rendere il linguaggio diagnostico, informativo e di semplice lettura. Questa semplificazione è avvenuta attraverso la adozione di un linguaggio uniforme che prevede l'inserimento di dati morfologici, sia macroscopici (gli stessi elencati sopra) che istologici, codificati e strutturati secondo una elencazione logica costante.

I parametri istologici vengono schematizzati in una tabella che riporta:

- 1)** Dimensione del cancro.
- 2)** Pattern di infiltrazione parietale della neoplasia. Analogamente alla classificazione di Ming per il carcinoma gastrico, e in accordo con i criteri definiti da Jass *et al* (103), sono stati distinti un pattern Infiltrativo ed uno Espansivo a seconda della modalità di avanzamento del fonte neoplastico nel contesto della parete intestinale.
- 3)** Infiltrato infiammatorio intra-tumorale (graduato in: assente, di basso grado, di alto grado).
- 4)** Necrosi neoplastica. Viene valutata in modo semiquantitativo e graduata utilizzando 4 range: <10%, 11-40%, 41-79% e >70%.
- 5)** Grado di differenziazione del cancro. In accordo con le linee guida della Organizzazione Mondiale della Sanità (107), i tumori sono stati graduati in **a**.

bene, **b.** moderatamente e **c.** scarsamente differenziati a seconda della proporzione di strutture ghiandolari che compongono il tumore.

- 6)** Invasione neoplastica vascolare.
- 7)** Invasione neoplastica perineurale.
- 8)** Componente adenomatosa adiacente alla neoplasia.
- 9)** Adenoma sincro alla neoplasia.
- 10)** Grado di regressione tumorale (TRG).

Nel caso di carcinomi (esclusivamente rettali) trattati con radio-chemio-terapia neo-adiuvante, la risposta del tumore alla terapia è valutata secondo i criteri di Mandard (104), che consistono in una scala che va da 1 (risposta completa, *i.e.* neoplasia assente) a 5 (assenza di risposta).

Una tabella ulteriore è dedicata allo *status* linfonodale e riporta:

- ❖ numero totale dei linfonodi esaminati,
- ❖ numero totale dei linfonodi metastatici,
- ❖ numero totale dei linfonodi isolati entro 3 cm dalla neoplasia,
- ❖ numero dei linfonodi metastatici entro 3 cm dalla neoplasia,
- ❖ numero totale dei linfonodi isolati a distanza superiore a cm 3 dalla neoplasia,
- ❖ numero dei linfonodi metastatici a distanza superiore a cm 3 dalla neoplasia,
- ❖ la misura del diametro maggiore dei linfonodi totali (*range*),
- ❖ la misura del diametro maggiore dei linfonodi metastatici (*range*).

Il *report* si conclude con la colo-rettale. Nei casi in cui siano isolati/esaminati <12 linfonodi, viene specificato il numero dei linfonodi a cui è limitata la valutazione dello *status* linfonodale, secondo le linee guida del sistema di colo-rettale pTNM dell' AJCC/UICC (105,106).

6.2.4 DATA BASE (EXCEL)

All'inizio del progetto prospettico, è stato creato un *data-base* su supporto elettronico che utilizza il sistema Excel. Settimanalmente, un medico trasferisce al data base i dati presenti nel referto cartaceo. Tale procedura ha consentito di disporre di informazioni standardizzate tali da consentire lo studio di popolazione che costituisce l'obiettivo del progetto.

Dal 2002, nel *data-base* vengono sistematicamente raccolti i seguenti dati:

1. Dati anagrafici: età e sesso.
2. U.O. di provenienza.
3. Numero di accettazione.
4. Sede del tumore.

Le sedi tumorali sono state classificate in accordo con *l'International Classification of Cancer Diseases for Oncology (107)* secondo i codici:

- C18.0 (cieco),
- C18.2 (colon ascendente),
- C18.3 (flessura epatica),
- C18.4 (colon trasverso),
- C18.5 (flessura splenica),
- C18.6 (colon discendente),
- C18.7 (sigma),
- C19.9 (giunto sigma-retto),
- C20.9 (retto).

La difformità di letteratura concernente i criteri topografici secondo cui raggruppare le diverse localizzazioni del CCR, ha indotto a prediligere il sistema di raggruppamento più frequentemente usato:

- colon destro (comprendente: cieco, colon ascendente e trasverso fino alla flessura epatica)
- colon sinistro (comprendente colon discendente, sigma),
- retto (2,8,11,14,15,19,20,23,30,31,32,48,108,109).

5. Lunghezza del colon.

6. Peso del FAP distinto in: a) isolato entro 3 centimetri e b) isolato oltre 3 centimetri dalla neoplasia.

7. Numero dei linfonodi (LN) isolati dal FAP e suddivisi in: a) numero totale di LN; b) numero totale di LN metastatici; c) numero totale di LN isolati entro 3 cm dalla neoplasia; d) numero di LN metastatici isolati entro 3 cm dalla neoplasia; e) numero totale di LN isolati a distanza superiore a cm 3 dalla neoplasia, e f) numero di LN metastatici a distanza superiore a cm 3 dalla neoplasia. Per il presente lavoro, e analogamente agli studi di letteratura, sono stati creati 5 gruppi di pazienti a seconda del numero dei linfonodi isolati: I) 0-3, II) 4-7, III) 8-11, IV) 12-15, V) >16 linfonodi.

8. Dimensioni dei LN suddivise in: a) diametro maggiore dei LN non metastatici e b) diametro maggiore dei LN metastatici.

9. Operatore (*i.e.* medico anatomo-patologo che ha ridotto manualmente il pezzo chirurgico), identificato da una sigla corrispondente alle iniziali di nome e cognome.

10. Dimensione della neoplasia.

11. Istotipo.

I CCR sono stati classificati secondo le linee guida della Organizzazione Mondiale della Sanità. Considerando solo gli adenocarcinomi, l'istotipo mucinoso è stato definito in base alla presenza di muco extracellulare (75).

- 12.** Grado di differenziazione della neoplasia.
- 13.** Pattern di infiltrazione parietale della neoplasia (Infiltrativo vs Espansivo).
- 14.** Necrosi neoplastica.
- 15.** Invasione neoplastica vascolare: assenza o presenza di neoplasia intravascolare sono identificate da un sistema binario.
- 16.** Invasione neoplastica perineurale: un sistema binario identifica la assenza o presenza di infiltrazione tumorale degli spazi perineurali.
- 17.** Infiltrato infiammatorio intratumorale.
- 18.** Lesioni polipoidi associate.

Sono state considerate 4 categorie di polipi: a) adenomi tradizionali, b) polipi iperplastici, c) adenomi serrati e d) adenomi serrati sessili. Per ciascuna delle lesioni sopracitate, sono state specificate: a) la presenza/assenza b) il numero e c) la sede. In caso di polipi multipli in segmenti colici diversi, la sede è stata identificata da un codice numerico esprime la coesistenza di due o più sedi diverse.

19. Tumori sincroni.

Secondo i criteri proposti da Moertel, tumori multipli presenti contemporaneamente nel segmento operatorio o insorti a distanza di tempo inferiore a 6 mesi l'uno dall'altro sono stati considerati "sincroni" (111). Tra tumori sincroni, è stato considerato come tumore principale quello con stadio più avanzato e di questo sono stati registrati i dati isto-patologici. Quando due o più neoplasie erano identiche per stadio, quella di maggiori dimensioni è stata considerata la lesione principale. Per questi casi, sono state create due colonne che hanno identificato a) la sede e b) il numero dei cancri coesistenti con il tumore primario.

20. Tumori metacroni.

Sono stati definiti in base ai criteri di Moertel (76) e applicati anche da altri lavori (31,36,112) ciascun tumore deve essere istologicamente confermato come adenocarcinoma; 2) il secondo tumore deve essere separato dalla precedente linea di anastomosi; 3) deve essere esclusa la possibilità che la seconda neoplasia rappresenti una recidiva della prima; 4) il secondo tumore deve essere diagnosticato almeno 6 mesi dopo il primo.

21. Stadiazione. Sono state create 4 colonne per identificare: T, N, M e stadio.

22. Grado di regressione tumorale (TRG).

6.2.5 MODALITÀ DI RECUPERO DEI DATI DI FOLLOW-UP

I dati sull' *outcome* di 1605 pazienti sono stati ottenuti secondo le seguenti modalità:

- grazie alla gentile collaborazione della Clinica Chirurgica II che ha operato la percentuale maggiore dei CCR e raccoglie sistematicamente i dati del *follow-up* dei propri pazienti, annotando: recidive (locali e a distanza), decessi correlati a malattia neoplastica, decessi non correlati a malattia neoplastica
- tramite personale esperto ed autorizzato dalle commissioni etiche locali ad eseguire indagini telefoniche.
- tramite un sistema di *software* informatico (SGP) collegato in rete ad una anagrafe di Stato che consente di trarre informazioni sullo *status* di vita/morte dei pazienti i cui campioni operatori sono stati accettati presso la nostra U.O.
- tramite un controllo eseguito mediante *software* "Armonia" per la ricerca di ulteriori recidive il cui referto istologico risulti archiviato presso la ex I U.O. di Anatomia Patologica.

6.3 METODI (GRUPPO B)

I dati anatomico-clinici e di *outcome* utilizzati per lo studio del gruppo A sono stati utilizzati per la ricerca di variabili correlate al rischio di recidiva di malattia nel sottogruppo di pazienti con CCR esente da metastasi linfonodali (e a distanza; *i.e.* stadi 0, I, II)

6.4 METODI (GRUPPO C)

6.4.1 ISTOLOGIA E IMMUNOISTOCHEMICA

La indagine per la ricerca di ITC è stata condotta con metodica immunoistochimica sui 5920 linfonodi regionali dei 361 pazienti appartenenti al gruppo C. Il numero medio di linfonodi esaminati per paziente è stato di 16.3 (*range* 0-107).

Dalla inclusione in paraffina di ciascun linfonodo (già analizzato [dopo fissazione in formalina 4%] con sezioni istologiche dello spessore di 4 µm colorate con Ematossilina-Eosina per le indagini diagnostiche di *routine*) sono state ottenute 2 sezioni istologiche supplementari dello spessore di 4 µm distanziate tra loro di 80-100 µm, per un totale di 11.840 sezioni. Le sezioni sono state de-paraffinate in xilene, reidratate e quindi incubate a diluizione 1:100 con l'anticorpo anticitocheratine MNF116 (Clone MNF 116 anticorpo murino monoclonale, diluizione 1:100, Dako).

(Tutte le reazioni (inclusi i controlli positivi e negativi) sono state eseguite in automatico secondo protocollo standardizzato applicato su macchinario *Ventana BenchMark IT immunostainer*, sotto supervisione di personale tecnico specialista.

In accordo con la definizione provveduta dall'AJCC/UICC, le ITC sono state identificate come cellule con caratteristiche morfologiche di malignità, isolate o in piccoli gruppi di dimensioni mai superiori a 0,02 cm, disperse nei sinusoidi e negli spazi extra-sinusoidali, inequivocabilmente positive alla immunoreazione per anticorpi anti-citocheratine e mai associate a reazione stromale.

La lettura dei preparati istologici per la indagine immunoistochimica delle ITC è stata operata in modo indipendente e alla cieca dei dati di *outcome* da due osservatori: un patologo con esperienza già acquisita sulla lettura immunoistochimica per la corretta identificazione delle ITC e il laureando (dopo adeguato periodo di *training*).

7. ANALISI STATISTICA

Quando appropriati, sono stati utilizzati i seguenti *tests*:

- Pearson χ^2
- Mann-Whitney
- Fisher's exact test
- Spearsman's rho survival analysis
- Log-rank test (Kaplan Meier)
- Ktau
- Bonferroni
- Cox Proportional Hazard regression model
- Logistic regression model

La relazione tra le variabili patologiche e OS/DFI è stata stimata usando il log-rank test.

Il Cox Proportional Hazard regression model è stato usato per valutare i fattori clinico patologici che potrebbero influenzare DFS e OS in maniera indipendente.

Quando appropriato, il rischio è stato calcolato come *Odds Ratio* od *Hazard Ratio*.

Al fine di identificare analiticamente il valore soglia (*cut-off* ottimale) del numero di linfonodi campionati in grado di predire la assenza di metastasi linfonodali, è stata utilizzata l'analisi *Receiver Operative Curves* non-parametrica (ROC).

Valori di $p < 0.05$ sono stati considerati come significativi, valori di p compresi tra 0.05 e 0.10 come indicativi di tendenza verso la significatività (*trend*), valori di $p > 0.10$ come non significativi.

Tutte le valutazioni statistiche sono state eseguite utilizzando il software STATA (*Stata Corporation, College Station, Texas, USA*).

8. RISULTATI

8.1 RISULTATI (GRUPPO A)

8.1.1 ASSOCIAZIONI TRA VARIABILI

Sono state analizzate le seguenti variabili:

- 1) Età, 2) Sesso, 3) Sede, 4) Stadio, 5) Istotipo, 6) Grado di differenziazione del tumore,
- 7) tumori Sincroni, 8) tumori Metacroni, 9) Numero di linfonodi esaminati, 10) presenza/assenza di Metastasi linfonodali, 11) Invasione Vascolare, 12) presenza/assenza di Adenomi, 13) Diametro del tumore.

ASSOCIAZIONI STATISTICAMENTE SIGNIFICATIVE IN ANALISI UNI-VARIATA

- **Età versus Sede** (Bonferroni-Bartlett's test; $p= 0.059$); (Tabella I).

Vi è differente distribuzione di sede a seconda dell'età: i pazienti con localizzazione rettale hanno in media una età inferiore rispetto a quelli con localizzazione colica.

SEDE	Obs	Età Media	Età Mediana	Età Min	Età Max
C. PROSSIMALE	549 (34%)	69.69	71	31	95
C. DISTALE	624 (39%)	67.96	69	32	99
RETTO	415 (26%)	64.86	65	21	90
.	18 (1%)
TOTALE	1606 (100%)				

La età di insorgenza è risultata significativamente differente nei seguenti confronti

(test di Bonferroni) fra le 3 sedi, in particolare:

- C. prossimale *versus* rettale ($p= 0.0001$),
- C. distale *versus* rettale ($p= 0.0001$),
- C. prossimale *versus* distale ($p= 0.03$).

- **Età *versus* Stadio** (test di Bonferroni ; $p= 0.0001$); (Tabella **II**).

Tabella II . Età di insorgenza Versus Stadio				
STADIO	Obs.	Età Media	Età min.	Età Max
0	67 (4%)	66.43	41	87
I	365 (23%)	68.41	21	93
II	474 (29.5%)	68.89	24	95
III	492 (31%)	68.33	31	99
IV	184 (11%)	63.63	32	87
.	24 (1.5%)	.	.	.
totale	1606 (100%)			

La età di insorgenza non è risultata significativamente differente nel confronto tra gli stadi I, II e III; nel confronto tra l'età media dei pazienti in stadio IV e quella dei pazienti in altri stadi è emersa una significativa differenza ad eccezione del confronto con lo stadio 0:

- Stadio 0 *versus* Stadio IV ($p= 0.9$)
- Stadio I *versus* Stadio IV ($p= 0.0001$)
- Stadio II *versus* Stadio IV ($p= 0.0001$)
- Stadio III *versus* Stadio IV ($p= 0.0001$)

- **Età versus Adenomi sincroni** (Two sample t test with equal variances ; $p= 0.03$); (Tabella **III**).

La prevalenza di adenomi sincroni a CCR tende ad aumentare all'aumentare della età:

- età media dei CCR senza adenomi sincroni: 67.5 anni
- età media dei CCR con adenomi sincroni: 68.8 anni

Tabella III. Presenza di Adenomi Sincroni a CCR Versus Età				
ADENOMI	Obs.	Età Media	Età Min	Età Max
Assenza	1271(79.2%)	67.55	21	99
Presenza	335(20.8%)	68.85	24	91
totale	1606 (100%)			

- **Sesso versus Sede** (test del χ^2 ; $p= 0.0001$); (Tabelle **IVa** e **IVb**).

La tabella **IVa** dimostra che:

- 1) nel sesso maschile, il C. colico prevale in sede sinistra;
- 2) nel sesso femminile (se si esclude la bassa prevalenza di Carcinoma rettale) il Carcinoma colico non ha predilezione di sede;
- 3) i pazienti con localizzazione colica prossimale sono prevalentemente femmine.

Tabella IVa . Distribuzione topografica per Sesso		
	SESSO	
SEDE	MASCHI (%)	FEMMINE (%)
PROSSIMALE	300 (32)	249 (38)
DISTALE	350 (37)	274 (42)
RETTO	285 (31)	130 (20)
TOTALE	935 (100)	653 (100)

La tabella **IVb** dimostra che:

- 1) Sia il C. prossimale sia il C. distale mostrano differente distribuzione tra i sessi con prevalenza nel sesso maschile (M/F: 55-56%/45-54%) ($p= 0.04$).
- 2) il C. rettale prevale nettamente nel sesso maschile (M/F: 68%/32%) ($p=0.0001$).

Tabella IVb . Distribuzione topografica per Sesso			
	SESSO		
SEDE	MASCHI	FEMMINE	TOTALE
PROSSIMALE (%)	300 (55)	249 (45)	549 (100)
DISTALE (%)	350 (56)	274 (44)	624 (100)
RETTO (%)	285 (68)	130 (32)	415 (100)

- **Sesso versus Adenomi sincroni** (test del χ^2 ; $p= 0.0001$); (Tabelle **Va** e **Vb**).

Tabella Va . Distribuzione degli Adenomi sincroni secondo Sesso		
	Adenomi sincroni	
SESSO	<u>NO</u> (%)	<u>Si</u> (%)
MASCHI	730 (57)	212 (63)
FEMMINE	541 (43)	123 (37)
TOTALE	1271 (100)	335 (100)

Tabella Vb . Distribuzione degli Adenomi sincroni secondo Sesso			
	Adenomi sincroni		
SESSO	<u>NO</u>	<u>Si</u>	TOTALE
MASCHI (%)	730 (77.5)	212 (22.5)	942 (100)
FEMMINE (%)	541 (81)	123 (19)	664 (100)

Gli adenomi sincroni a CCR sono più frequenti nel maschio.

•**Sesso versus Stadio**(test del χ^2 ; $p= 0.0001$); (Tabella **VI**)

In tutti gli stadi la prevalenza del carcinoma è prevalente nel sesso maschile (Stadio 0 : 70% ; Stadio I : 60% ; Stadio II :52% ; Stadio III 60% ; Stadio IV 61%).

Nel sesso femminile sono più frequenti Stadi II, mentre nel sesso maschile prevalgono Stadi III.

Tabella VI . Distribuzione del Sesso secondo Stadio		
	SESSO	
STADIO	Uomini	Donne
0	47 (5)	20 (3)
I	220 (24)	145 (22)
II	247 (27)	227 (34)
III	296 (32)	196 (30)
IV	113 (12)	71 (11)
totale	923(100%)	659 (100%)

- **Sede versus Adenomi sincroni** (test del χ^2 ; $p= 0.0001$); (Tabella VII).

Tabella VII. Distribuzione topografica degli Adenomi sincroni		
SEDE	Adenomi sincroni	
	NO (%)	Si (%)
PROSSIMALE	402 (32)	147 (44)
DISTALE	496 (39)	128 (39)
RETTO	358 (29)	57 (17)
TOTALE	1256 (100)	332 (100)

Gli adenomi sincroni sono associati più frequentemente ai Carcinomi a localizzazione prossimale rispetto a quelli distali e del retto.

- **Sede versus Stadio** (test del χ^2 ; $p= 0.0001$); (Tabella VIII).

- 1) Nel C. destro prevale lo stadio II;
- 2) nel C. sinistro prevale lo stadio III;
- 3) il C. rettale (a differenza del C. prossimale e distale) mostra una elevata prevalenza di stadio I (30%).

Tabella VIII. Stratificazione delle Sedi di insorgenza secondo Stadio			
STADIO	SEDE		
	C. PROSSIMALE (%)	C. DISTALE (%)	RETTALE (%)
0	25 (5)	16 (2)	26 (7)
I	100 (18)	139 (23)	121 (30)
II	196 (35)	171 (28)	102 (25)
III	175 (32)	203 (33)	109 (27)
IV	52 (10)	85 (14)	44 (11)
totale	548 (100%)	614 (100%)	402 (100%)

• **Sede versus Istotipo** (test del χ^2 ; $p= 0.003$); (Tabella **IX**).

- 1) L'istotipo NAS è più frequente in ogni sede (Prossimale: 86% ; Distale: 91% Rettale: 91%), prediligendo in particolare la localizzazione Distale;
- 2) Gli istotipi Mucinoso e Midollare prevalgono in sede prossimale;
- 3) Gli istotipi Squamoso ed Adeno-Squamoso sono localizzati esclusivamente in sede Distale.

Tabella IX . Distribuzione topografica secondo Istotipo			
	ISTOTIPO		
SEDE	NAS (%)	MUCINOSO MIDOLLARE (%)	Squamoso Adeno-squamoso (%)
PROSSIMALE	470 (34)	77 (48)	0 (0)
DISTALE	568 (41)	50 (31)	3 (75)
RETTO	355 (25)	33 (21)	1 (25)
TOTALE	1393 (100)	160 (100)	4 (100)

• **Sede versus Grading** (test del χ^2 ; $p= 0.0001$); (Tabella **X**).

- 1) La frequente coesistenza di diversi gradi di differenziazione costituisce il motivo per cui la maggioranza dei casi è assegnata ad un grado di differenziazione intermedio (grado 2); tale grado costituisce il più frequente in tutte le sedi (C. destro= 55%; C. sinistro=67%; CR=66%);
- 2) i Carcinomi scarsamente differenziati prevalgono in sede prossimale.

Tabella X . Distribuzione topografica secondo Grading			
	GRADING		
SEDE	1 (%)	2 (%)	3 (%)
PROSSIMALE	77 (36)	299 (31)	169 (46)
DISTALE	79 (36)	415 (43)	126 (35)
RETTO	60 (28)	251 (26)	70 (19)
TOTALE	216 (100)	965 (100)	365 (100)

- **Sede versus status linfonodale** (test del χ^2 ; $p= 0.02$); (Tabella**XI**).

Il riscontro di metastasi linfonodali è significativamente più associato a carcinomi insorti in sede colica distale.

Tabella XI . Distribuzione topografica secondo Status Linfonodale		
	STATUS LINFONODALE	
SEDE	N- (%)	N+(%)
PROSSIMALE	329 (35)	219 (34)
DISTALE	341 (37)	273 (43)
RETTO	262 (28)	146 (23)
TOTALE	932 (100)	638 (100)

- **Sede versus Dimensioni Neoplasia** (t test $p= 0.0001$; Tabella **XII**).

Il diametro medio delle neoplasie campionate diminuisce progressivamente passando da localizzazione colica prossimale alla distale; in particolare, il diametro dei Carcinomi rettali è significativamente inferiore a quello dei Carcinomi colici.

Tale evenienza correla naturalmente col fatto che ciascuna sede presenta delle caratteristiche anatomico-fisiologiche che possano favorire e/o sfavorire la crescita del tumore o renderne più precoce la scoperta.

Una neoplasia in sede prossimale può crescere fino a raggiungere notevoli dimensioni senza dare sintomi degni di nota, mentre, in sede rettale, neoplasie anche di piccole dimensioni danno più frequentemente segni e sintomi come alterazioni dell'alvo, dolore e rettorragia.

Tabella XII . Dimensione del tumore Versus Sede				
	Diametro MEDIO	Diametro mediano	Min	Max
SEDE	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)
PROSSIMALE	4.58	4	0.5	15
DISTALE	4.04	4	0.6	14
RETTO	3.54	3	0.1	12

La differenza è statisticamente significativa in generale e confrontando ciascuna sede l'una con l'altra (test di Bonferroni) :

- Sede Colica Prossimale *versus* Distale ($p= 0.0001$),
- Sede Colica Prossimale *versus* Rettale ($p= 0.0001$),
- Sede Colica Distale *versus* Rettale ($p= 0.0001$).

• **Stadio versus Grading** (test del χ^2 ; $p= 0.0001$); (Tabelle **13a** e **13b**).

Pur rimanendo il Grado 2 (per le stesse ragioni di cui sopra) il più rappresentato in tutti gli stadi (ad eccezione dello stadio 0), si è osservato che:

- 1) Il CCR ben differenziato (G1) è associato a stadi iniziali (Stadio 0+I+II= 83%);
- 2) il CCR scarsamente differenziato (G3) prevale negli stadi avanzati (Stadio II + III =69%);
- 3) la percentuale dei C. scarsamente differenziati (G3) cresce progressivamente dallo Stadio 0 allo Stadio IV.

Tabella **XIIIa.** *Stratificazione del Grado per Stadio*

STADIO	GRADO		
	1 (%)	2 (%)	3 (%)
0	46 (22)	3 (1)	1 (0.3)
I	95 (44)	216 (22)	43 (12)
II	36 (17)	329 (34)	108 (29)
III	28 (13)	310 (32)	150 (41)
IV	9 (4)	109 (11)	66 (18)
totale	214 (100)	967 (100)	368 (100)

Tabella **XIIIb.** *Distribuzione del Grado secondo Stadio*

STADIO	GRADO			totale
	1 (%)	2 (%)	3 (%)	
0 (%)	46 (92)	3 (6)	1 (2)	50 (100)
I (%)	95 (27)	216 (61)	43 (12)	354 (100)
II (%)	36 (7)	329 (69)	108 (22)	473 (100)
III (%)	28 (6)	310 (64)	150 (31)	488 (100)
IV (%)	9 (5)	109 (59)	66 (36)	184 (100)

- **Stadio versus Istotipo** (test del χ^2 ; $p= 0.0001$); (Tabella **XIV**).

L'istotipo NAS prevale in tutti gli stadi (stadio 0=98%; stadio I= 92%; stadio II= 88%; stadio III= 87%; stadio IV= 94%).

Gli Istotipi Mucinoso e Midollare tendono a presentarsi più di frequente in Stadi alti (77,5% tra Stadio II e III.) , mentre la distribuzione dei NAS è più omogenea.

<i>Tabella XIV. Stratificazione di Istotipo secondo Stadio</i>			
	ISTOTIPO		
STADIO	<u>NAS</u> (%)	<u>MUCINOSO</u> <u>MIDOLLARE</u> (%)	<u>Adenosquamoso</u> (%)
0	49 (3.5)	1 (0.5)	0 (0)
I	336 (24)	24 (15)	3 (100)
II	414 (30)	59 (37)	0 (0)
III	426 (30.4)	64 (40.5)	0 (0)
IV	173 (12.3)	11 (7)	0 (0)
TOTALE	1398 (100)	159 (100)	3 (100)

- **Grading versus Invasione Vascolare** (test del χ^2 ; $p= 0.0001$); (Tabella**XV**).

Al diminuire del grado di differenziazione, aumenta la percentuale di CCR con invasione vascolare.

<i>Tabella XV. Percentuale di casi con invasione vascolare secondo Grado</i>			
	GRADO		
INVASIONE VASCOLARE	<u>1</u> (%)	<u>2</u> (%)	<u>3</u> (%)
NO	171 (78)	462 (48)	104 (28.4)
Sì	47 (22)	510 (52)	262 (71.6)
TOTALE	218 (100)	972 (100)	366 (100)

• **Carcinomi Sincroni/Metacroni versus Sesso** (*test del χ^2 ; p=0.041*); (Tabella **XVI**).

- 1) In ambedue i sessi, i carcinomi sincroni sono più frequenti dei metacroni (maschi: 82%; femmine: 65%);
- 2) I CCR sincroni sono più frequenti nei maschi;
- 3) i CCR metacroni sono similmente distribuiti tra i due sessi.

Tabella XVI . Distribuzione di CCR Sincroni e Metacroni per Sesso			
	SESSO		
CCR	MASCHI	FEMMINE	TOTALE
SINCRONI (%)	55 (65)	30 (35)	85 (100)
METACRONI (%)	12 (43)	16 (57)	28 (100)

• **Carcinomi Sincroni/Metacroni versus Istotipo** (*test del χ^2 ; p=0.022*); (Tabella **XVII**).

- 1) L'istotipo NAS è come sempre il più frequente sia nei sincroni (72%) che nei metacroni (100%);
- 2) Tenendo conto che il dato può essere influenzato dall'esiguità dei casi, si è osservata totale assenza di istotipo mucinoso e/o a componente mucinosa nei CCR Metacroni

Tabella XVII . Distribuzione dei CCR Sincroni e Metacroni per Istotipo			
	ISTOTIPO		
CCR	NAS	MUCINOSO MIDOLLARE	TOTALE
SINCRONI (%)	71 (84)	14 (16)	85 (100)
METACRONI (%)	28 (100)	0 (0)	28 (100)

- **Invasione Vascolare versus Pattern** (test del χ^2 ; $p= 0.0001$); (Tabella XVIII).

Carcinomi a pattern d'infiltrazione infiltrativo sono associati significativamente ad invasione vascolare.

Tabella XVIII. Prevalenza di invasione vascolare per Pattern		
	PATTERN	
INVASIONE VASCOLARE	ESPANSIVO (%)	INFILTRATIVO (%)
NO	437 (52)	225 (36)
Si	403 (48)	407 (64)
TOTALE	840 (100)	632 (100)

- **Status linfonodale versus Numero linfonodi esaminati** (test di Mann-Whitney; $p= 0.0001$); (t-test; $p= 0.0001$; Tabella XIX).

Tabella XIX . Numero di linfonodi campionati versus Status linfonodale				
STATUS LINFONODALE	NUMERO MEDIO LN	ERR. ST.	DEV. ST.	CI 95%
N-	14.96	0.33	10.28	14.3-15.6
N+	17.77	0.40	10.27	16.97-18.56

Nei casi N- e N+, il numero medio di linfonodi isolati è risultato significativamente diverso ($p= 0.0001$).

- **Status linfonodale versus pT** (test del χ^2 ; $p= 0.0001$); (Tabella **XX**).

All'aumentare della profondità di infiltrazione parietale del tumore, aumenta la percentuale dei casi con metastasi linfonodali, con un netto stacco tra pT2 e pT3 (invasione della sierosa).

Tabella XX . Distribuzione dello Status linfonodale secondo Profondità di infiltrazione nella parete			
	STATUS LINFONODALE		
pT	N-	N+	TOTALE
0 (%)	23 (88)	3 (12)	26 (100)
is (%)	49 (96)	2 (4)	51 (100)
1 (%)	111 (93)	8 (7)	119 (100)
2 (%)	260 (82)	56 (18)	316 (100)
3 (%)	453 (49)	465 (51)	918 (100)
4 (%)	48 (28)	126 (72)	174 (100)

- **Status linfonodale versus Grado** (test del χ^2 ; $p= 0.0001$); (Tabella **XXI**).

- 1) La percentuale dei casi con metastasi linfonodali cresce con la de-differenziazione del Carcinoma.
- 2) la maggioranza (57%) dei CCR G3 ha metastasi linfonodali.
- 3) la maggioranza dei CCR G1 (84%) e G2 (60%) non ha metastasi linfonodali.

Tabella XXI. Distribuzione dello Status linfonodale secondo Grado			
	STATUS LINFONODALE		
GRADO	N-	N+	TOTALE
1 (%)	183 (84)	36 (16)	219 (100)
2 (%)	585 (60)	394 (40)	976 (100)
3 (%)	159 (43)	210 (57)	369 (100)

• **Status linfonodale versus Pattern** (*test del χ^2 ; p= 0.0001*); (Tabella **XXII**).

1) La percentuale dei casi con metastasi linfonodali è maggiore nei casi di Carcinoma a pattern invasivo.

2) la maggioranza (66%) dei CCR con pattern espansivo non si accompagna a metastasi linfonodali.

3) la maggioranza dei CCR con metastasi linfonodali si accompagna a pattern invasivo (55%).

Tabella XXII . Distribuzione del Pattern secondo Status linfonodale		
	STATUS LINFONODALE	
pattern	N-	N+
Espansivo (%)	551 (66)	286 (45)
Invasivo (%)	282 (34)	344 (55)
totale(%)	833(100)	630(100)

• **Status linfonodale versus Invasione Vascolare** (*test del χ^2 ; p= 0.0001*);

(Tabelle **XXIIIa** e **XXIIIb**).

1) La maggior parte dei CCR con linfonodi metastatici (76%) ha invasione neoplastica vascolare;

2) il 60% dei casi con invasione vascolare ha metastasi linfonodali.

Tabella XXIIIa . Distribuzione della Invasione Vascolare secondo Status Linfonodale		
	STATUS LINFONODALE	
INVASIONE VASCOLARE	N- (%)	N+ (%)
NO	585 (64)	151 (24)
Si	327 (36)	489 (76)
TOTALE	912 (100)	640 (100)

Tabella XXIIIb . Status Linfonodale versus Invasione Vascolare			
	STATUS LINFONODALE		
INVASIONE VASCOLARE	N-	N+	TOTALE
NO(%)	585 (79)	151 (21)	736 (100)
Si (%)	327 (40)	489 (60)	816 (100)

- **Status linfonodale versus Dimensione tumorale** (*t-test*; $p=0.0001$);

(Tabella **XXIV**).

La dimensione media (diametro maggiore medio) dei Carcinomi è risultata significativamente correlata alla presenza di metastasi linfonodali.

Tabella XXIV . Diametro tumorale versus Status Linfonodale				
	DIAMETRO MEDIO	ERR. ST.	DEV. ST.	CI 95%
STATUS LN				
N-	3.95	0.06	2.09	3.8-4.0
N+	4.33	0.07	1.9	4.1-4.4

- **Status linfonodale versus Età** (*t-test; p= 0.0069*); (Tabella **XXV**).

La prevalenza dei casi con metastasi linfonodali diminuisce all'aumentare dell'età.

L'età media dei pazienti senza metastasi linfonodali è maggiore rispetto all'età media dei pazienti con metastasi linfonodali

Tabella XXV . Età versus Status Linfonodale				
	Età MEDIA	ERR. ST.	DEV. ST.	CI 95%
STATUS LN				
N-	68.42	0.36	11.34	67.7 – 69.1
N+	66.96	0.46	11.98	66.0 – 67.8

- **Numero linfonodi esaminati versus Sede** (*test p= 0.0001*; Tabella **XXVI**).

Il numero medio dei linfonodi campionati diminuisce progressivamente passando da localizzazione colica prossimale alla distale; in particolare nei C. rettali, la media di linfonodi campionati è stata significativamente inferiore a quella dei Carcinomi colici, tale da rasentare il cutoff minimi per campionamento adeguato .

Tabella XXVI . Numero linfonodi campionati versus Sede di neoplasia				
	N. LN ISOLATI MEDIA	n. mediano	N. Min	N. Max
SEDE				
PROSSIMALE	19.26	17	0	107
DISTALE	15.47	14	1	81
RETTO	13.02	11	0	67

La differenza è statisticamente significativa in generale e confrontando ciascuna sede l'una con l'altra (test di Bonferroni) :

- Sede Colica Prossimale *versus* Distale ($p= 0.0001$),
- Sede Colica Prossimale *versus* Rettale ($p= 0.0001$),
- Sede Colica Distale *versus* Rettale ($p= 0.0001$).

Le variabili risultate indipendenti in analisi univariata (test del χ^2) sono state:

- Sesso-età ($p= 0.2$)
- Polipi Iperplastici associati a CCR-Età ($p= 0.6$)
- Polipi Iperplastici associati a CCR-Grado ($p= 0.3$)
- Polipi iperplastici associati a CCR-Istotipo ($p= 0.17$)
- Adenomi associati a CCR-Istotipo ($p= 0.2$)
- Adenomi associati a CCR-Grado ($p=0.9$)
- Adenomi associati a CCR-stadio ($p= 0.6$)
- Sede-Polipi iperplastici associati a CCR ($p= 0.7$)
- Status linfonodale-Sede ($p= 0.17$)
- Status linfonodale-Adenomi associati a CCR ($p= 0.9$)
- Sesso-Istotipo ($p= 0.1$)
- Invasione vascolare -Istotipo ($p= 0.3$)
- CCR Singoli/Sincroni-pT ($p= 0.4$)
- CCR Singoli/Sincroni-Sesso ($p= 0.18$)
- CCR Singoli/Sincroni-Stadio ($p= 0.2$)
- CCR Singoli/Sincroni-Adenomi associati a CCR ($p= 0.4$)
- CCR Singoli/Sincroni-Grado ($p= 0.9$)

- CCR Singoli/Sincroni-Istotipo ($p= 0.6$)
- CCR Singoli/Sincroni-Polipi iperplastici associati a CCR ($p= 0.4$)
- CCR Sincroni/Metacroni-Sede ($p= 0.2$)
- CCR Sincroni/Metacroni-pT ($p= 0.2$)
- CCR Sincroni/Metacroni-Grado($p= 0.5$)
- CCR Sincroni/Metacroni-Adenomi sincroni a CCR ($p= 0.1$)
- CCR Sincroni/Metacroni-Stadio($p= 0.2$)
- CCR Sincroni/Metacroni-Polipi Iperplastici sincroni a CCR ($p= 0.3$)

Le variabili che, in analisi univariata (test del χ^2), hanno dimostrato un trend di associazione sono state:

- Sesso-Grado ($p= 0.05$),
- Sesso-Polipi iperplastici associati a CCR ($p= 0.08$),
- CCR Singoli/Sincroni-Età ($p= 0.08$)
- Pattern-Istotipo ($p= 0.05$)

ASSOCIAZIONI STATISTICAMENTE SIGNIFICATIVE IN ANALISI MULTI-VARIATA

In analisi multi-variata (regressione logistica), sono risultate significativamente correlate alla presenza/assenza di metastasi linfonodali:

- la età, a intendersi che carcinomi insorti in pazienti più giovani tendono ad essere più aggressive / metastatizzanti ($p= 0.024$; OR= 0.9 ; IC= 0.97-0.97);
- la de-differenziazione tumorale ($p= 0.0001$; OR=1.7 ; IC= 1.41-2.11)
- la presenza di invasione neoplastica vascolare ($p= 0.0001$; OR= 4.8 ; IC= 3.80-6.09)

- La profondità di infiltrazione della parete intestinale (pT) ($p=0.0001$; OR=2.9; IC= 2.39-3.69)

- Il numero di linfonodi isolati ($p= 0.006$; OR= 1.01 ; IC= 1.00-1.02).

Un *trend* di significatività è stato trovato per la localizzazione del carcinoma in sede distale ($p= 0.051$; OR= 1.3 ; IC= 0.99-1.79).

8.1.2 ASSOCIAZIONI CON RICORRENZA DI MALATTIA

Sono state analizzate le seguenti variabili in rapporto all'evento Ricorrenza di Malattia e alla variabile temporale Tempo Libero da Malattia (*Desease Free Interval – DFI*):

1) età, 2) sesso, 3) sede, 4) Profondità d'infiltrazione nella parete intestinale, 5) presenza/assenza di metastasi linfonodali, 6) stadio, 7) Dimensioni del tumore , 8) istotipo, 9) Pattern d'infiltrazione della neoplasia, 10) grado di differenziazione del tumore, 11) invasione neoplastica vascolare, 12) Grado di Regressione Tumorale, 13) presenza/assenza di Polipi Iperplastici, 14) presenza/assenza di Adenomi, 15) numero di linfonodi esaminati, 16) Status linfonodale in linfonodi campionati entro e oltre cm 3 dalla neoplasia, 17) Numero dei linfonodi metastatici campionati entro e oltre la neoplasia.

ASSOCIAZIONI STATISTICAMENTE SIGNIFICATIVE IN ANALISI UNI-VARIATA

• **Età versus Recidiva di Malattia** (Two sample t test ; $p= 0.0015$); (Tabella I).

L'età media dei pazienti che hanno avuto ritorno di malattia è significativamente diversa dall'età media dei pazienti sani al momento dell'ultimo *follow-up*.

Tabella I. Età versus Ricorrenza di Malattia					
R	Obs	Età Media	Età Mediana	Età Min	Età Max
No	1344 (84%)	68.22	69	21	99
Sì	262 (16%)	65.76	66	24	89
TOTALE	1606 (100%)				

• **Sede versus Ritorno di Malattia** (test del χ^2 ; $p= 0.002$); (tabelle **IIa** e **IIb**)
(Bonferroni-Bartlett's test) (Tabella **IIc**).

Tabella IIa. Stratificazione della Recidiva di Malattia per Sede		
	R	
SEDE	No (%)	Sì (%)
DESTRO	479 (36)	70 (27)
SINISTRO	524 (40)	100 (38)
RETTO	325 (24)	90 (35)
TOTALE	1302 (100)	260 (100)

Tabella IIb. Percentuale di Ritorno di Malattia per Sede			
	R		
SEDE	No	Sì	TOTALE
DESTRO (%)	479 (87)	70 (13)	549 (100)
SINISTRO (%)	524(84)	100 (16)	624 (100)
RETTO (%)	325 (78)	90 (22)	415 (100)

Il numero assoluto di ricorrenza di malattia si osserva in sede colica distale, tuttavia i carcinomi ad insorgenza rettale tendono a recidivare più spesso.

Tabella IIc . Tempo libero da Malattia secondo Sede di insorgenza (Mesi)					
SEDE	Obs.	Tempo Libero da Malattia			
		Medio	Mediano	min.	Max
PROSSIMALE	545 (34%)	39.96	49	0	83
DISTALE	618 (39%)	37.85	45.5	0	83
RETTALE	409 (26%)	36.68	41	0	69
.	17 (1%)
totale	1606 (100%)				

L'intervallo libero da malattia non è risultato statisticamente differente tra le varie sedi d'insorgenza, pur mostrando una progressiva tendenza ad essere più breve allontanandosi dalla sede prossimale verso la sede rettale (test di Bonferroni) :

- C. Prossimale *versus* C. Distale ($p=0.245$),
- C. Distale *versus* Rettale ($p= 1.000$),
- C. Prossimale *versus* Rettale ($p= 0.045$).

Carcinomi insorti in sede rettale tendono ad avere intervallo libero da malattia più breve.

- **Status linfonodale *versus* Recidiva di Malattia** (test del χ^2 ; $p= 0.0001$);

(Tabella **III**).

Come atteso, la presenza di metastasi linfonodali si accompagna significativamente a ritorno di malattia.

Tabella III . Status linfonodale versus Recidiva di Malattia			
	R		
STATUS LINFONODALE	NO	Si	TOTALE
N- (%)	816 (87)	128 (13)	944 (100)
<u>N+ (%)</u>	512 (79)	132 (21)	644 (100)

La percentuale di recidive è significativamente più alta tra i pazienti nei quali era stata documentata presenza di metastasi linfonodali.

• **Stadio versus Recidiva di Malattia** (test del χ^2 ; $p= 0.0001$); (Tabella **IVa** e **IVb**)

Lo stadio che tende più frequentemente ad avere ritorno di malattia è lo Stadio III ; verosimilmente gli Stadi IV tendono più all'*exitus* (vedi oltre).

Tabella IVa . Stratificazione per Stadio del Recidiva di Malattia		
	R	
STADIO	No (%)	Si (%)
0	62 (5)	5 (2)
I	330 (25)	35 (13)
II	395 (30)	79 (31)
III	386 (29)	106 (41)
IV	150 (11)	34 (13)
totale	1323 (100%)	259(100%)

Tabella IVb . Percentuale di Recidiva di Malattia per Stadio			
	R		
STADIO	No	Si	totale
0 (%)	62 (93)	5 (7)	67 (100%)
I (%)	330 (91)	35 (9)	365 (100%)
II (%)	395 (83)	79 (17)	474 (100%)
III (%)	386 (78)	106 (22)	492 (100%)
IV (%)	150 (82)	34 (18)	184 (100%)

All'aumentare dello Stadio di malattia, aumenta parallelamente la ricorrenza della malattia , come atteso.

- **Pattern versus Recidiva di Malattia** (test del χ^2 ; $p= 0.003$); (Tabella **V**).

Il ritorno di malattia tende a prevalere nei carcinomi a pattern d'infiltrazione invasivo

Tabella V . Percentuale di Recidiva di Malattia secondo Pattern			
	R		
pattern	No	Si	Totale
Espansivo (%)	720 (86)	121 (14)	841 (100)
Invasivo (%)	505 (80)	128 (20)	633 (100)

- **Invasione Vascolare versus Recidiva di Malattia** (test del χ^2 ; $p= 0.046$); (Tabella **VI**)

La percentuale di ricorrenza di malattia tende ad essere maggiore in quei pazienti per i quali si era osservata invasione neoplastica vascolare.

Tabella VI. Recidiva versus Malattia secondo Invasione Vascolare			
	R		
INVASIONE VASCOLARE	NO	Si	TOTALE
NO(%)	639 (86)	108 (14)	747 (100)
Si (%)	670 (82)	149 (18)	819 (100)

• **Metastasi in linfonodi campionati entro cm3 dalla neoplasia versus Recidiva di Malattia** (*test del χ^2 ; p= 0.0003*); (Tabella VII)

Tabella VI. Recidiva versus Status linfonodale entro cm 3			
	R		
Metastasi entro	No	Si	Totale
NO(%)	830 (86)	132 (14)	961 (100)
Si (%)	455 (79)	119 (21)	574 (100)

La percentuale di ritorno di malattia nei pazienti che abbiano metastasi in linfonodi localizzati ad una distanza dalla neoplasia minore di cm 3 è significativamente maggiore, con un Odds Ratio= 1.644 (I.C. =1.239-2.179), rispecchiando il dato sullo Status linfonodale.

Le variabili risultate indipendenti in analisi univariata (*test del χ^2*) sono state:

- Sesso- (*p= 0.2*)
- pT (*p= 0.4*)
- Dimensioni del tumore (*p= 0.9*)
- Istotipo (*p= 0.3*)
- Grado (*p= 0.13*)

- Grado di Regressione Tumorale ($p= 0.17$)
- Sincroni-Polipi iperplastici associati a CCR ($p= 0.9$)
- Adenomi associati a CCR ($p= 0.5$)
- Numero dei linfonodi campionati ($p= 0.28$)
- Status dei linfonodi campionati oltre cm 3 ($p= 0.21$)

ASSOCIAZIONI STATISTICAMENTE SIGNIFICATIVE IN ANALISI MULTI-VARIATA

In analisi multi-variata (regressione logistica), sono risultate significativamente correlate all'evento Ricorrenza di Malattia:

- la età, a intendersi che carcinomi insorti in pazienti più giovani tendono ad essere più aggressivi/metastatizzanti ($p= 0.001$; OR= 0.98 ; IC= 0.96-0.99);
- la presenza di invasione neoplastica vascolare ($p= 0.068$; OR= 1.3 ; IC= 0.98-1.74).

La de-differenziazione tumorale e il numero di linfonodi campionati non hanno per il ritorno di malattia lo stesso peso che invece presentano per il decesso.

In analisi multi-variata (regressione Cox), sono risultate significativamente correlate al Tempo Libero da Malattia:

- La Flogosi, a intendersi che l'intensità della stessa abbia funzione protettiva ($p= 0.040$; HR= 0.48; IC= 0.24-0.96);
- la Sede, a intendersi che la localizzazione rettale è maggiormente aggressiva ($p= 0.006$; HR= 1.67; IC= 1.15-2.43);
- l'Istotipo, a intendersi che gli istotipi diversi dal NAS (mucinoso, midollare) mostrano una maggiore tendenza alla diffusione ($p= 0.027$; HR= 1.66; IC= 1.05-2.62);
- la presenza di Invasione Vascolare ($p= 0.003$; HR= 1.55; IC= 1.1677 – 2.0695),

- il *Pattern* di crescita, a intendersi che il pattern infiltrativo si associa ad un rischio maggiore di diffusione di malattia ($p= 0.009$; HR= 1.42; IC= 1.09-1.85),
- *Status* linfonodale ($p= 0.024$; HR= 1.39; IC= 1.043-1.85),
- La profondità di infiltrazione della parete intestinale (pT) ($p=0.002$; HR=8.76; IC= 2.27-33.85);

La età non ha per il ritorno di malattia lo stesso peso che invece presenta per il decesso.

8.1.3 ASSOCIAZIONI CON DECESSO PER MALATTIA

Sono state analizzate le seguenti variabili in rapporto all'evento Decesso per Malattia e alla variabile temporale Sopravvivenza Globale (*Overall Survival* – OS):

- 1) Età, 2) Sesso, 3) Sede, 4) Profondità d'infiltrazione nella parete intestinale, 5) presenza/assenza di metastasi linfonodali, 6) Stadio, 7) Dimensioni del tumore , 8) istotipo, 9) Pattern d'infiltrazione della neoplasia, 10) Grado di differenziazione del tumore, 11) Invasione Vascolare, 12) Grado di Regressione Tumorale, 13) presenza/assenza di Polipi Iperplastici, 14) presenza/assenza di Adenomi, 15) numero di linfonodi esaminati, 16) *Status* linfonodale in linfonodi campionati entro e oltre cm 3 dalla neoplasia, 17) Numero dei linfonodi metastatici campionati entro e oltre 3 cm dalla neoplasia.

ASSOCIAZIONI STATISTICAMENTE SIGNIFICATIVE IN ANALISI UNI-VARIATA

- **Età versus Decesso per Malattia** (Two sample t test ; $p= 0.0002$); (TabellaI).

Come atteso, l'età avanzata si associa più di frequente all' *exitus*.

Tabella I. Et� Versus Decesso					
Decesso per Malattia	Obs	Et� Media	Et� Mediana	Et� Min	Et� Max
<u>No</u>	1228 (77%)	67.21	68	21	99
<u>Sì</u>	376 (23%)	69.73	70	24	94
TOTALE	1606 (100%)				

• **pT versus Decesso per Malattia** (test del χ^2 ; $p= 0.0001$); (Tabella II)

Tabella II. Percentuale di decessi secondo Profondit� dell'infiltrazione tumorale			
pT	Decesso per Malattia		TOTALE
	No	Sì	
0 (%)	24 (93)	2 (7)	26 (100)
is (%)	49 (96)	2 (4)	51 (100)
1 (%)	108 (92)	10 (8)	118 (100)
2 (%)	270 (85)	46 (15)	316 (100)
3 (%)	682 (74)	236 (26)	918 (100)
4 (%)	93 (54)	80 (46)	173 (100)

Come atteso, la percentuale di decessi cresce col progredire dell'infiltrazione della parete intestinale, in particolare si ha un picco per il pT4 in cui si ha invasione diretta di peritoneo e organi adiacenti.

• **Status linfonodale versus Decesso per Malattia** (test del χ^2 ; $p= 0.0001$);

(Tabelle IIIa e IIIb).

Come atteso, il decesso si accompagna significativamente al riscontro di metastasi linfonodali nel campionamento chirurgico.

Tabella IIIa . Percentuale di pazienti con interessamento linfonodale secondo Decessi		
	Decesso per Malattia	
STATUS LINFONODALE	NO(%)	Si (%)
N-	804 (66)	140 (37)
N+	413 (34)	231 (63)
Totale	1216 (100)	371 (100)

Tabella IIIb . Percentuale di Decessi secondo Status Linfonodale			
	Decesso per Malattia		
STATUS LINFONODALE	NO	Si	TOTALE
N- (%)	804 (85)	140 (15)	944 (100)
N+ (%)	413 (64)	231 (36)	644 (100)

La percentuale di decessi è significativamente più alta tra i pazienti nei quali era stata documentata presenza di metastasi linfonodali rispetto i pN0.

• **Stadio versus Decesso per Malattia** (*test del χ^2 ; p= 0.0001*); (Tabelle **IVa** e **IVb**)

Come atteso, vi è un progressivo aumento dei decessi col progredire dello Stadio di malattia , in particolare per lo Stadio IV si osserva la più alta percentuale di decessi , superiore al 50%.

Tabella IVa. Stratificazione dei decessi per Stadio		
	Decesso per Malattia	
STADIO	No (%)	Sì (%)
0	64 (5)	3 (1)
I	322 (27)	43 (11)
II	403 (33)	70 (19)
III	342 (28)	150 (41)
IV	80 (7)	104 (28)
totale	1211 (100%)	370 (100%)

Tabella IVb. Percentuale di Decessi per Stadio			
	Decesso per Malattia		
STADIO	No	Sì	totale
0(%)	64 (96)	3 (4)	67 (100%)
I(%)	322 (88)	43 (12)	365 (100%)
II(%)	403 (85)	70 (15)	473 (100%)
III(%)	342 (70)	150 (30)	492 (100%)
IV(%)	80 (43)	104 (57)	184 (100%)

- **Pattern versus Decesso per Malattia** (test del χ^2 ; $p= 0.0001$); (Tabelle Va e Vb)

Il decesso tende a prevalere nei carcinomi a *pattern* d'infiltrazione invasivo.

Tabella Va. Stratificazione dei decessi per Pattern		
	Decesso per Malattia	
pattern	<u>NO(%)</u>	<u>Sì (%)</u>
<u>Espansivo</u>	687 (62)	153 (42)
<u>Invasivo</u>	422 (38)	211 (57)
<i>Totale</i>	(100)	(100)

Tabella Vb. Percentuale di Decessi secondo Pattern			
	Decesso per Malattia		
Pattern	No	Si	Totale
Espansivo (%)	687 (81)	153 (18)	840 (100)
Invasivo (%)	422 (66)	211 (34)	633 (100)

La percentuale di decessi è significativamente più alta nei pazienti per i quali si era osservato pattern d'infiltrazione della neoplasia invasivo, confermando un'associazione a maggiore aggressività.

• **Grading versus Decesso per Malattia** (test del χ^2 ; $p= 0.0001$); (Tabella VI)

Tabella VI. Percentuale di Decessi secondo Grading			
	Decesso per Malattia		
GRADO	No	Si	TOTALE
1 (%)	187 (86)	31 (14)	218 (100)
2 (%)	748 (77)	227 (23)	975 (100)
3 (%)	254 (68)	115 (32)	369 (100)

La percentuale dei decessi aumenta con il progredire della de-differenziazione del carcinoma.

• **Invasione Vascolare versus Decesso per Malattia** (test del χ^2 ; $p= 0.0001$);
(Tabelle VIIa e VIIb)

Il decesso tende a prevalere in quei pazienti per i quali si era osservata invasione neoplastica vascolare.

Tabella VIIa. <i>Invasione Vascolare secondo decessi</i>		
	Decesso per Malattia	
INVASIONE VASCOLARE	NO(%)	Si (%)
NO	636 (54)	110 (29)
Si	557 (46)	261 (71)
Totale	1193 (100)	371 (100)

Tabella VIIb. <i>Invasione Vascolare secondo decessi</i>			
	Decesso per Malattia		
INVASIONE VASCOLARE	No	Si	Totale
NO(%)	636 (85)	110 (15)	746 (100)
Si (%)	557 (68)	261 (32)	818 (100)

La percentuale di decessi tende ad essere maggiore in quei pazienti per i quali si era osservata invasione neoplastica vascolare.

• **TRG versus Decesso per Malattia** (test del χ^2 ; $p= 0.029$); (TabellaVIII)

Tabella VIII. <i>Percentuale dei Decessi secondo Tumor Regression Grade</i>			
	Decesso per Malattia		
TRG	<u>No</u>	<u>Si</u>	TOTALE
0 (%)	1 (100)	0 (0)	1 (100)
1 (%)	25 (93)	2 (7)	27 (100)
2 (%)	31 (94)	2 (6)	33 (100)
3 (%)	44 (76)	14 (24)	58 (100)
4 (%)	44 (75)	15 (25)	59 (100)
5 (%)	11 (61)	7 (39)	18 (100)

La percentuale di decessi tende ad aumentare in parallelo alla quantità di malattia residua post-radioterapia.

• **Metastasi in linfonodi campionati entro cm3 dalla neoplasia versus Decesso per Malattia** (cc e test del χ^2 ; $p= 0.0001$); (Tabelle IXa e IXb)

Tabella IXa. Percentuale di metastasi entro cm3 nei decessi		
	Decesso per Malattia	
Metastasi entro	NO(%)	Si (%)
NO	816 (69)	145 (41)
Si	370 (37)	204 (58)
Totale	1186 (100)	349 (100)

Tabella IXb. Percentuale di Decessi secondo Status linfonodale entro cm 3 dalla neoplasia			
	Decesso per Malattia		
Metastasi	No	Si	Totale
NO(%)	816 (85)	145 (15)	961 (100)
Si (%)	370 (65)	204 (35)	574 (100)

Rispecchiando il dato sullo *Status* linfonodale, abbiamo trovato che il riscontro di metastasi nei linfonodi localizzati ad una distanza dalla neoplasia minore di cm3 si associa un Odds Ratio = 3.102 (I.C.=2.4-3.99) per il decesso.

• **Metastasi in linfonodi campionati oltre cm3 dalla neoplasia versus**

Decesso per Malattia (cc e *test del χ^2* ; $p= 0.029$); (Tabella X)

Tabella X. Percentuale di Decessi secondo Status linfonodale oltre cm3			
	Decesso per Malattia		
Metastasi oltre	No	Si	Totale
NO(%)	1064 (81)	253 (19)	1317 (100)
Si (%)	80 (51)	76 (49)	156 (100)

La percentuale di decessi nei pazienti che abbiano metastasi linfonodali anche in linfonodi localizzati ad una distanza dalla neoplasia maggiore di cm 3 è significativamente maggiore ($p=0.0001$), con un Odds Ratio= 3.99 (I.C.= 2.79-5.7).

Le variabili risultate indipendenti in analisi univariata (*test del χ^2*) sono state:

- Sesso ($p= 0.13$)
- Sede ($p= 0.639$)
- Istotipo ($p= 0.13$)
- Adenomi associati a CCR ($p= 0.2$)
- Polipi iperplastici associati a CCR ($p= 0.19$)
- Adenomi associati a CCR ($p= 0.5$)
- Numero dei linfonodi campionati ($p= 0.28$)
- Dimensioni del tumore ($p= 0.07$ [Trend])

ASSOCIAZIONI STATISTICAMENTE SIGNIFICATIVE IN ANALISI MULTI-VARIATA

In analisi multi-variata (regressione logistica), sono risultate significativamente correlate all'evento Decesso per Malattia:

- la Età, a intendersi che pazienti più anziani tendono ad andare incontro ad *exitus* più di frequente ($p= 0.001$; OR= 1.018; IC= 1-1.02)
- la De-differenziazione tumorale ($p= 0.009$; OR=1.8657 ; IC= 1.16-2.98),
- la presenza di Invasione Vascolare neoplastica ($p= 0.0001$; OR= 2.56 ; IC= 1.97-3.35)
- Il Numero di linfonodi isolati ($p= 0.066$; OR= 0.98; IC= 0.97-1);

Un *trend* di significatività è stato trovato per la localizzazione del carcinoma in sede distale ($p= 0.051$; OD= 1.3 ; IC= 0.99-1.79).

In analisi multi-variata (regressione Cox), sono risultate significativamente correlate al Tempo di Sopravvivenza Globale:

- La Età, a intendersi come sopra, che con l'avanzare degli anni il rischio di andare incontro all'evento aumenti ($p= 0.0001$; HR= 1.023; IC= 1.013-1.033);
- La Sede, a intendersi che la localizzazione rettale è maggiormente aggressiva ($p= 0.008$; HR= 1.51; IC= 1.11-2);
- la presenza di Invasione Vascolare neoplastica ($p= 0.0001$; HR= 1.62; IC= 1.24-2),
- Il *Pattern* di crescita, a intendersi che il pattern infiltrativo si associa ad un rischio maggiore di andare incontro all'*exitus* ($p= 0.001$; HR= 1.49 ; IC= 1.19-1.87),
- Status linfonodale, a confermare il dato che una malattia metastatica sia più aggressiva ($p= 0.0001$; HR= 1.84; IC= 1.44-2.35),
- La profondità di infiltrazione della parete intestinale (pT) ($p=0.012$; HR=2.86; IC= 1.25-6.51);

8.2 RISULTATI (GRUPPO B)

Sono state eseguite delle analisi in multivariata con regressione logistica e Cox prendendo in considerazione i pazienti pN0 (944 pazienti, il 59% della casistica totale).

In regressione logistica si sono messe a confronto le seguenti variabili:

- Il Grado di de-differenziazione della neoplasia
- Il riscontro di Invasione Vascolare
- La età alla insorgenza del carcinoma
- Numero di linfonodi campionati

Ponendo come evento finale il Ritorno di Malattia e il Decesso per malattia.

Tabella (I). Ritorno di Malattia						
Variabile	Odds Ratio	Z	P	Intervallo di Confidenza		Sign.
Grado	2.0959		0.016	1.1485	3.8249	Si
Invasione Vascolare			0.395			NO
Età	0.9841	-1.85	0.064	0.9677	1.0009	TREND
Numero linfonodi campionati	0.9797	-0.61	0.053	0.9595	1.0002	TREND

Per quanto riguarda il rischio di Ricorrenza di malattia, soltanto il Grado di de-differenziazione mantiene una significatività, mentre Età e Numero di linfonodi presentano un *trend* di associazione protettivo.

Il dato concernente la Età si può spiegare col fatto che all'aumentare degli anni di età è più frequente che il paziente vada incontro ad *exitus* piuttosto che a recidiva.

Il dato sul numero di linfonodi campionati è importante poiché suggerisce che un adeguato campionamento è critico per individuare correttamente metastasi linfonodali.

Tabella (II). Decesso per Malattia						
Variabile	Odds Ratio	Z	P	Intervallo di Confidenza		Sign.
Grado	1.7775		0.092	0.9107	3.4691	TREND
Invasione Vascolare	1.5144		0.036	1.0284	2.2299	Si
Età	1.0428		0.0001	1.0234	1.0626	Si
Numero linfonodi campionati			0.540			NO

Per quanto riguarda il rischio di Decesso per Malattia, ad avere una significatività sono Età e Invasione Vascolare, mentre il Grado di de-differenziazione presenta solo un *trend* di significatività. (Il dato sulla età conferma le nostre attese).

In regressione Cox, si sono messe a confronto le seguenti variabili:

- Età alla insorgenza del carcinoma
- Sesso
- Sede colica *versus* sede rettale
- Dimensione della neoplasia
- Istotipo
- Pattern di crescita
- Necrosi tumorale
- Flogosi
- Invasione Vascolare
- Invasione perineurale
- Grado di de-differenziazione della neoplasia

- Adenomi sincroni al CCR
- Polipi Iperplastici sincroni al CCR
- Adenocarcinomi sincroni al CCR
- pT : profondità d'infiltrazione tumorale nella parete intestinale.

Tabella (III) . Tempo Libero da Malattia						
Variabile	Hazard Ratio	Z	P	Intervallo di Confidenza		Sign.
Età			0.237			no
Sesso			0.881			No
Sede Colica/Rettale	1.7880		0.005	1.1947	2.6761	Si
Dimensioni			0.233			No
Istotipo	22.5505		0.008	2.2648	224.5306	Si
Pattern	1.5814		0.022	1.0697	2.3378	Si
Necrosi			0.414			No
Flogosi	0.6432	-2.03	0.043	0.4199	09853	Si
Invasione Vascolare			0.470			No
Invasione Perineurale			0.404			No
Grading			0.574			No
Adenomi			0.882			No
Polipi iperplastici			0.303			No
Sincroni			0.617			No
pT	0.5104		0.073	0.2450	1.0634	Trend

Tutto ciò suggerisce che nei pazienti pN0 i parametri indipendenti da tenere in considerazione per stratificare correttamente il rischio di ciascun paziente dovrebbero comprender un'attenta valutazione del Pattern di crescita, dell'Istotipo del carcinoma, della intensità della reazione linfomonocitaria, prestando particolare attenzione ai pazienti con localizzazione rettale, per i quali le neoplasie appaiono comportarsi in maniera più aggressiva.

8.3 RISULTATI (GRUPPO C)

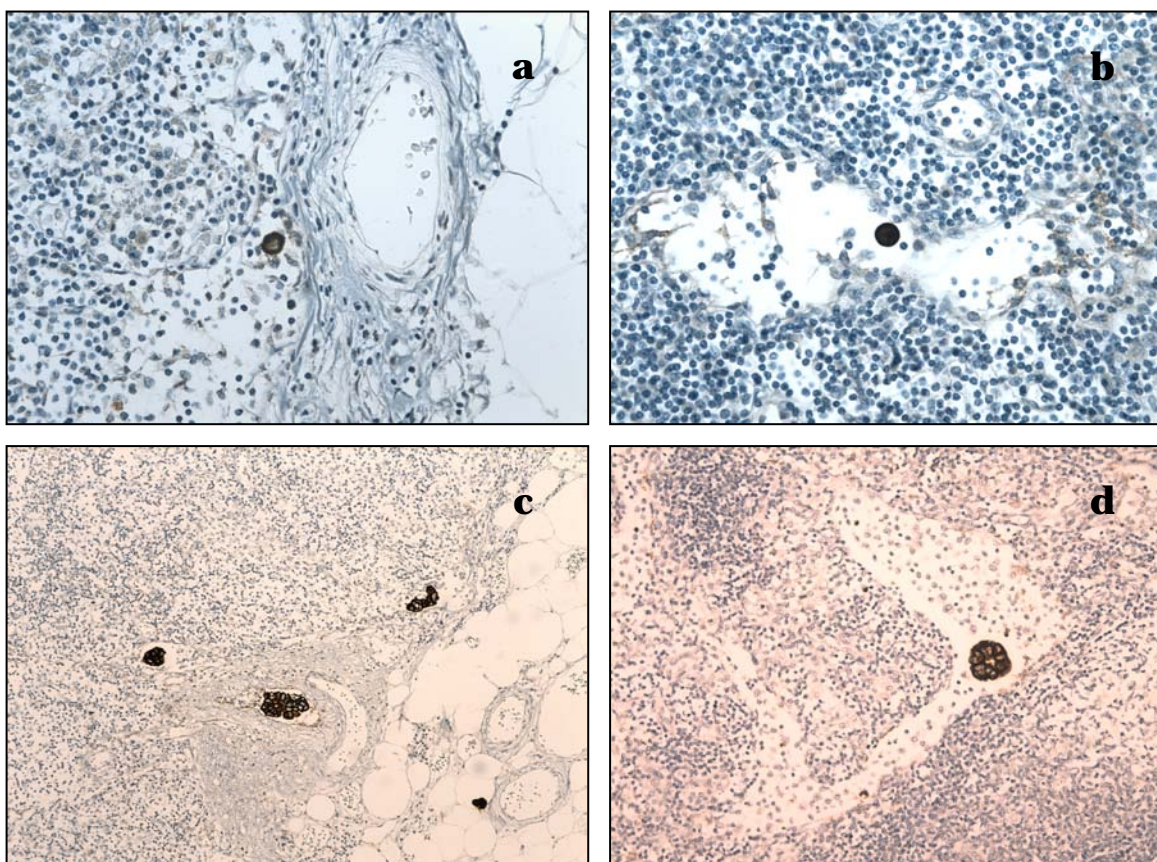


Figura 1. ITC.

- a) Cellula Tumorale Isolata in seno sottocapsulare ;
- b) Cellula Tumorale Isolata in vaso linfatico paracorticale;
- c) *Clusters* di ITC in seno sottocorticale;
- d) *Cluster* di ITC in vaso linfatico paracorticale.

5920 linfonodi da 361 pazienti sono stati riesaminati dopo immunoreazione con anticorpo monoclonale anticitocheratine MNF116 (Clone MNF 116 anticorpo murino monoclonale, diluizione 1:100, Dako).

Cellule neoplastiche positive all'anticorpo sono state trovate in 287 dei 5920 linfonodi (0,47%) da 200 dei 361 pazienti (55.5%).

8.3.1 ASSOCIAZIONI TRA ITC E VARIABILI CLINICO-PATOLOGICHE

Tabella (I) . Parametri clinico-patologici dei pazienti e presenza di ITC					
		ITC -	ITC +	N.linfonodi ITC+	
	CASI	N (%)	N (%)		p
totale	361	161 (44.48%)	200 (55.52%)	767	
Sesso					
Maschi	210	93 (44.28%)	117 (55.72%)	466	n.s.
Femmine	150	67 (44.66%)	83 (55.44%)	301	
Sede tumore					
Colon destro	147	58 (39.45%)	89 (60.55%)	333	n.s.
Colon sinistro	136	65 (47.79%)	71 (52.21%)	300	
Retto	74	36 (48.64%)	38 (51.36%)	123	
Istotipo					
NAS	336	150 (44.64%)	186 (55.36%)	721	n.s.
Mucinoso midollare	25	11 (44%)	14 (56%)	46	
Grado					
1	89	59 (66.29%)	30 (33.71%)	112	0.0001
2	223	80 (35.87%)	143 (64.13%)	567	
3	49	22 (44.89%)	27 (55.11%)	88	
Invasione vascolare					
No	249	120 (48.19%)	129 (51.81%)	491	0.019
Sì	108	38 (35.18%)	70 (64.82%)	275	
Pattern					
espansivo	223	93 (41.70%)	130 (58.30%)	446	n.s.
invasivo	101	32 (31.68%)	69 (68.32%)	320	
pT					
is	27	26 (96.30%)	1 (3.7%)	1	n.s.
1	40	34 (85%)	6 (15%)	9	
2	100	46 (46%)	54 (54%)	165	
3	179	51 (28.49%)	128 (71.51%)	516	
4	14	3 (21.42%)	11 (78.58%)	31	
Stadio Patologico (UICC)					
0	27	26 (96.26%)	1 (3.74%)	1	0.0001
I	139	79 (56.83%)	60 (43.17%)	174	
II	194	55 (28.35%)	139 (71.65%)	592	
III	.				

IV	.				
CCR singoli, sincroni, metacroni					
Singoli	342	152 (44.44%)	190 (55.56%)	731	n.s.
Sincroni	14	7 (50%)	7 (50%)	17	
Metacroni	5	1 (20%)	4 (80%)	19	
Adenomi Sincroni					
No	290	130 (44.82%)	160 (55.18%)	577	n.s.
Sí	71	31 (43.66%)	40 (56.34%)	190	
Polipi Iperplastici Sincroni					
No	339	151 (44.54%)	188 (55.46%)	717	n.s.
Sí	22	10 (45.45%)	12 (54.55%)	50	
Terapia neo- adiuvante (Retti)					
No	74	36 (48.64%)	38 (51.36%)	123	0.0001
Sí	40	33 (82.5%)	7 (17.5%)	9	

ITC sono state identificate in 200/361 (55.5%) pazienti, per un totale di linfonodi 767 ITC+/5920 (13%).

Il numero medio di linfonodi esaminati è stato di 16.4.

Il numero medio di linfonodi esaminati nel gruppo ITC+vo è stato 14, quello del gruppo ITC-vo di 18.

Il numero medio di linfonodi isoalti differisce significativamente tra il gruppo ITC+vo e ITC-vo ($p=0.0001$) (Grafico I).

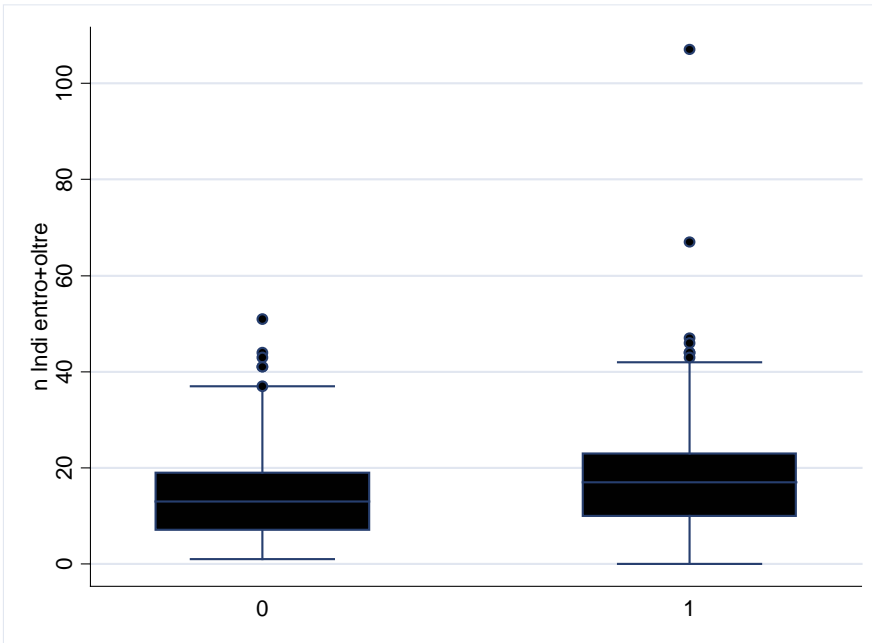


Grafico I. Ordinata = N.di linfonodi campionati ; Ascissa = ITC - , ITC +

Tuttavia, il numero medio di linfonodi campionati non differisce tra coloro che abbiano avuto ritorno di malattia (14.17) e coloro riferiti in salute al momento dell'ultimo *follow-u* $p(16.72)$ ($p=0.1026$) (grafico II).

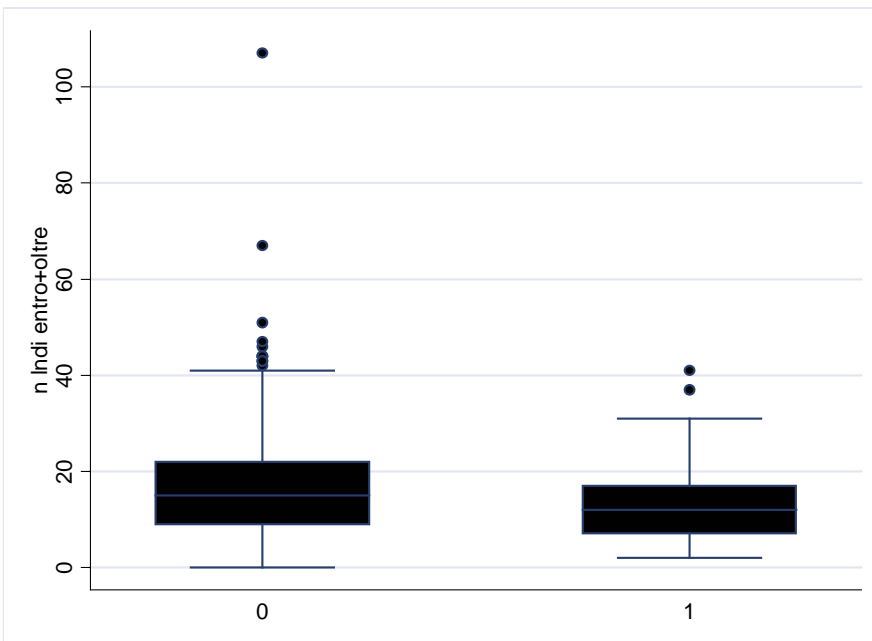


Grafico II. Ordinata = N.di linfonodi campionati ; Ascissa = Recidiva 0, Recidiva +

Il numero assoluto di linfonodi in cui siano state trovate ITC non è influenzato dal numero di linfonodi campionati ($p=1.000$).

Vista l'importanza che riveste l'interessamento linfonodale, ci è di fondamento sapere di essere in possesso di un numero di linfonodi adeguato per il nostro studio.

Non volendoci basare sui soli dati della letteratura (alquanto eterogenei), è stata utilizzata l'analisi *Receiver Operative Curves* non-parametrica (ROC) al fine di individuare il valore di *cutoff* ottimale con miglior bilanciamento tra Sensibilità e Specificità nell'individuare le ITC. Tale valore è risultato di 14 linfonodi, caratterizzato da Sensibilità 62.19% e Specificità 54,04%. Infatti, andando a studiare l'associazione tra presenza/assenza di ITC in pazienti con linfonodi campionati <14 *versus* pazienti con linfonodi campionati ≥ 14 si è trovata una correlazione statisticamente significativa con una probabilità doppia che le itc vengano identificate nel secondo gruppo ($p=0.002$; OR= 1.93; IC= 1.24-3.012).

Variabili patologiche significativamente associate allo *status* di ITC:

-ITC/stadio ($p=0.0001$);

-ITC/grading ($p=0.0001$);

-ITC/invasione vascolare ($p=0.019$);

-ITC/numero di linfonodi campionati ($p=0.0001$);

-ITC/numero di linfonodi campionati maggiore o uguale a 14 ($p=0.002$; OR= 1.93; IC= 1.24-3.01).

Variabili patologiche non associate allo *status* di ITC:

-ITC/istotipo ($p=0.955$)

-ITC/sede ($p=0.411$)

8.3.2 ASSOCIAZIONI CON RECIDIVA E DECESSO PER MALATTIA

Durante il periodo di osservazione 36 pazienti hanno sviluppato ritorno di malattia e 51 sono deceduti nel post-operatorio per cause riconducibili alla neoplasia.

Il CCR ha recidivato in 36/361 (9%) dei casi; 29 delle 36 recidive (80%) sono state documentate tra i 200 pazienti ITC+ (14.5%) ; 7 delle 36 recidive (20%) invece sono state documentate tra i 161 pazienti ITC - (4.3%).

Il ritorno di malattia correla quindi significativamente con la status di ITC+ ($p=0.0021$, OR= 3.57; 95% CI=1,46-9,95; case-control Pearson Chi2).

L'intervallo mediano libero da malattia per il gruppo ITC- contro ITC+ è stato di 56 contro 54 mesi rispettivamente, mentre il tempo medio è stato rispettivamente di 52 contro 46 mesi ($p=0.0005$).

L'intervallo mediano di sopravvivenza per il gruppo ITC- contro ITC+ è stato di 57 contro 57.5 mesi, ed il tempo medio rispettivamente di 54 contro 52.6 ($p=0.4$).

L'Analisi univariata è stata utilizzata per valutare l'impatto della positività immunohistochimica nei linfonodi e delle variabili clinico patologiche sulla prognosi dei pazienti con carcinoma colo rettale a interessamento linfonodale negativo (pNO).

Il numero di linfonodi campionati non influisce sul tempo libero da malattia, sia in assoluto sia binarizzando il numero di linfonodi campionati in maggiore o minore di 14 ($p=0.1026$) ($p=0.217$).

L'età dei pazienti non ha influito sul tempo libero da malattia ($p=0.1$).

La presenza di ITC nei linfonodi non influisce sulla sopravvivenza globale ($p=0.4$ -log-rank ; $p=0.2$ -Pearson chi2) bensì si associa significativamente ad un intervallo libero da malattia più breve ($p=0.0005$ - log-rank ; $p=0.002$ -Pearson chi2), come possiamo osservare anche sulle curve di Kaplan-Meier ricavate (Grafici III-IV-V-VI).

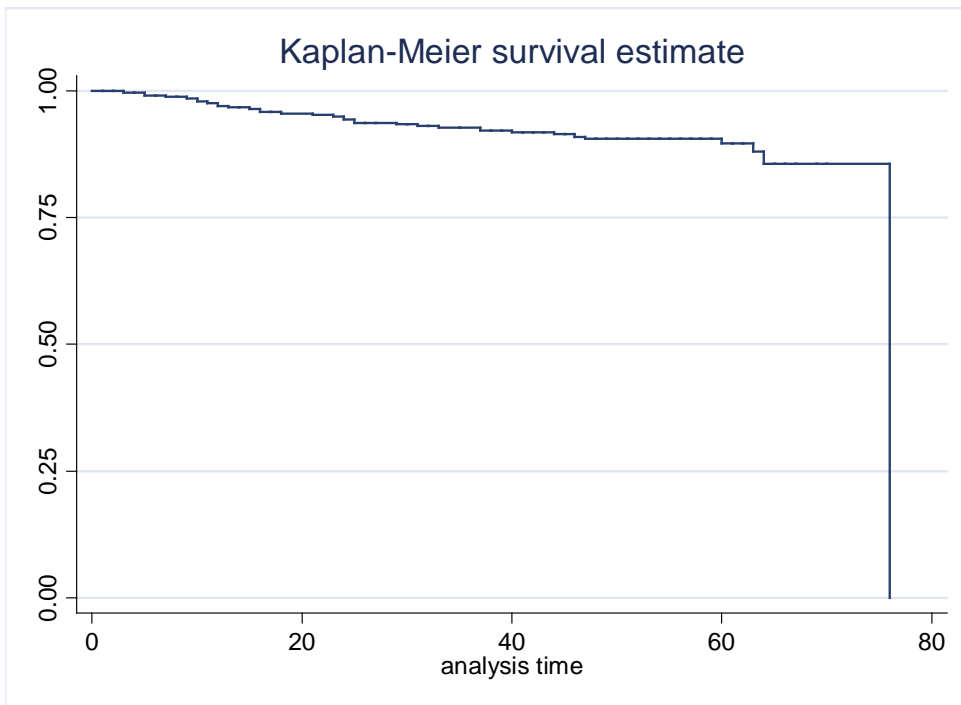


Grafico III . Generale Tempo Libero da Malattia.

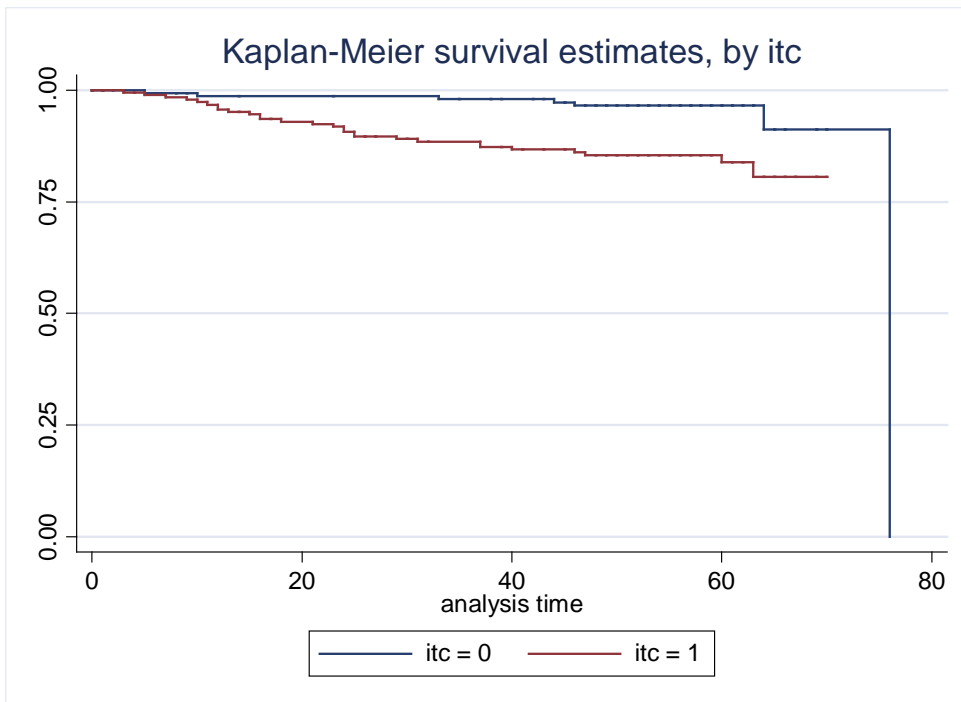


Grafico IV. Stratificazione per positività a ITC.

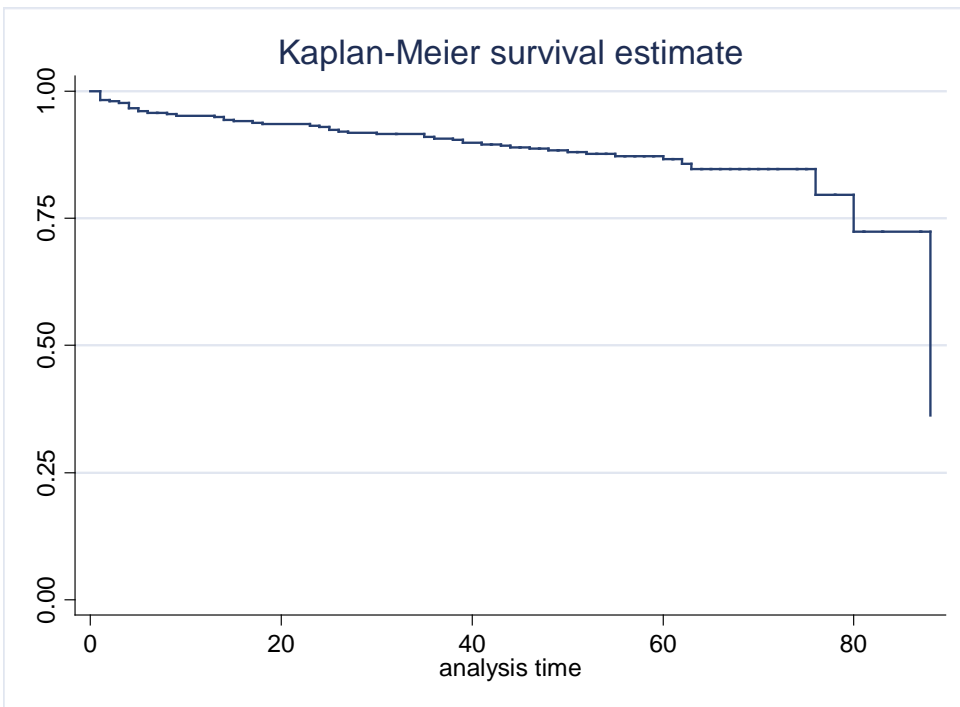


Grafico V. Sopravvivenza Generale.

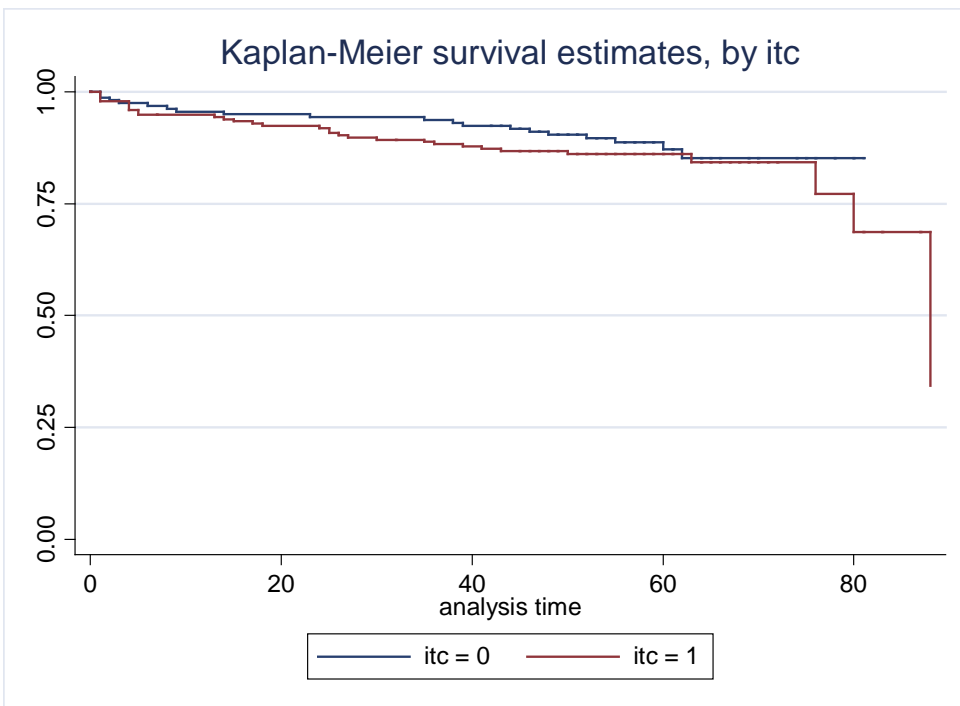


Grafico VI . Sopravvivenza stratificata per positività ad ITC.

Inoltre, ad intervallo libero da malattia minore sia associa anche il numero assoluto /quantità di linfonodi interessati da ITC, all'aumentare dei quali aumenta il rischio di recidiva (p=0.003).

L'analisi di regressione multivariata Cox (impostata sulla variabile tempo intervallo libero da malattia) ha rilevato che il solo fattore prognostico indipendente significativo è proprio la presenza di ITC nei linfonodi ($p=0.009$; hazard ratio= 3.6 ; IC =1.37-9.58).

Ulteriori osservazioni sono state condotte stratificando i linfonodi a seconda del fatto che fossero stati campionati ad una distanza inferiore o superiore ai cm 3 dalla neoplasia.

Dei 767 linfonodi in cui sono state ritrovate ITC, 668 (87%) si localizzano entro cm3 mentre 100 (13%) si localizzano oltre cm 3, con una media di ITC per paziente di 1.85 nei linfonodi entro cm 3 e di 0,27 nei linfonodi oltre cm 3.

Abbiamo già detto che il numero assoluto di linfonodi interessati da ITC si associa a maggior ritorno di malattia, osservando le analisi sulla stratificazione per localizzazione vediamo che la presenza in sé di ITC anche in linfonodi distali non si associa a malattia più aggressiva ($p=0.086$), piuttosto correla significativamente la quantità di ITC nei linfonodi prossimali.

La media di ITC ritrovate nei linfonodi prossimali differisce in maniera significativa tra pazienti che abbiano recidivato (3) e pazienti in salute al momento dell'ultimo follow-up (1.7) ($p=0.002$).

9. DISCUSSIONE

Il presente elaborato ha come oggetto di studio una corte consecutiva di pazienti con carcinoma colo-rettale arruolati in modo prospettico dopo intervento chirurgico radicale effettuato presso le strutture sanitarie di Padova tra il 2002 e il 2008 e per i quali siano state ottenute informazioni sull'*outcome*.

Al fine di caratterizzare il fenotipo del CCR e di individuare parametri istopatologici predittivi di aggressività biologica e comportamento clinico della malattia, lo studio è stato organizzato estraendo dal gruppo principale (Gruppo A) due ulteriori sottogruppi (Gruppo B e Gruppo C).

Con lo stesso scopo, la parte iniziale di questo elaborato riporta i più recenti dati che la letteratura internazionale ha prodotto in studi di popolazione concernenti il CCR.

Rispetto alla maggioranza di questi ultimi, il presente lavoro ha la caratteristica di essere strutturato come una ricerca prospettica che ha arruolato pazienti consecutivi: tale impostazione e la numerosità dei casi considerati costituiscono la specificità di questo studio.

GRUPPO A

Di questa coorte, sono state studiate e tra loro correlate le caratteristiche fenotipiche del CCR. Tra le variabili considerate (età, sesso, sede, stadio, istotipo, grado di differenziazione del tumore, tumori sincroni, tumori metacroni, numero di linfonodi esaminati, presenza/assenza di metastasi linfonodali, invasione neoplastica vascolare, presenza/assenza di adenomi e/o polipi iperplastici associati al tumore e terapia neo-adiuvante), sono state ricercate quelle correlate al rischio di ricorrenza neoplastica e/o decesso per neoplasia.

I risultati ottenuti confermano i dati complessivi della letteratura ma le caratteristiche (già citate) di impostazione dello studio e del campione considerato conferisce loro elevata affidabilità e rilevanza.

GRUPPO B

Questo gruppo è costituito solo dai pazienti pN0 (944) che rappresentano il 60% della casistica principale considerata nel gruppo A.

La mortalità e/o ricorrenza di malattia legati al CCR sono strettamente condizionate dalla presenza di metastasi linfonodali.

Come dimostrato dalla letteratura, tuttavia, il 20-30% dei pazienti con CCR pNOM0 (stadi 0, II,II; *i.e.* senza diffusione linfonodale e/o a distanza) va incontro a recidiva di malattia entro 5 anni.

Obiettivo dello studio di questa casistica selezionata dal gruppo A è stato quello di indagare la esistenza di possibili fattori isto-prognostici in grado di identificare, tra questo sottogruppo di soggetti, quelli a maggior rischio di ricorrenza.

In analisi di regressione multivariata (*Cox* e *Logistica*), i parametri indipendenti che influenzano la recidiva di malattia in assenza di metastasi linfonodali sono: a) grado di differenziazione ($p=0.01$; $OR=2.09$), b) istotipo (mucinoso e/o con componente mucinosa) ($p=0.008$; $HR=22.55$), c) *pattern* (infiltrativo) di diffusione parietale ($p=0.02$; $HR=1.6$) e d) reazione flogistica intra e/o peritumorale ($p=0.04$; $HR=0.6$ ["effetto protettivo"]). Solo un *trend* di significatività ($p=0.07$) è stato dimostrato per la estensione tumorale (pT).

Per pazienti senza evidenza di metastasi sistemiche, la accurata valutazione dello *status linfonodale* è essenziale per la corretta determinazione dello stadio e per

l'indicazione alla terapia adiuvante. In generale, il rischio di sottostadiare lo *status linfonodale* diminuisce all'aumentare del numero dei linfonodi esaminati.

Molti studi hanno dimostrato che il numero di linfonodi mesenterici isolati dal fibroadiposo peri-intestinale è soggetto a variabilità anatomica e dipendente sia dalla estensione della linfadenectomia sia da un adeguato isolamento, da parte del patologo, dei linfonodi chirurgicamente asportati.

Sulla base di questo, le linee guida attuali raccomandano che un numero minimo di 12 linfonodi deve essere istologicamente esaminato per poter considerare (con possibilità di errore minima) pazienti pN0 effettivamente liberi da metastasi linfonodali.

Il numero medio di linfonodi isolati per caso nel gruppo B è stato pari a 15 (*range* 0-107), superiore a quello minimo richiesto per una adeguata valutazione dello *status* linfonodale.

Nel nostro sotto-gruppo di studio, il numero dei linfonodi esaminati non ha condizionato in modo significativo l'*outcome* ($p=0.05$; OR=0,97). Questo dato dimostra la accuratezza (chirurgica e patologica) dello *staging* linfonodale operato presso la nostra Istituzione.

GRUPPO C

Il gruppo C è stato selezionato dal precedente per studiare il significato biologico delle Cellule Tumorali Isolate (ITC) come ulteriore elemento prognostico utile ad identificare pazienti con CCR pN0 a rischio di ricorrenza neoplastica.

Le ITC sono definite dalla *International Union Against Cancer* (UICC/AJCC) come cellule tumorali singole o aggregate in *clusters* di dimensioni inferiori a 0,02 cm e rilevabili con metodica immunohistochimica o molecolare, ma anche in Ematossilina-

Eosina. A differenza delle metastasi (dimensioni > 0,2 cm) e delle micrometastasi (dimensioni comprese tra 0,02 cm e 0,2 cm), le ITC non partecipano alla definizione dello stadio ma vengono riportate come pNO (*i+*) o pNO (*mol+*) a seconda della metodica con cui vengono identificate.

Per questo studio, abbiamo preferito la metodica immunoistochimica alla tecnica molecolare per le seguenti ragioni: a) maggiore praticità di utilizzo (essendo gli anticorpi anti-citocheratine utilizzati per questo studio disponibili nella pratica quotidiana come mezzo di ausilio della diagnostica di *routine*), b) minore costo; c) maggiore specificità e affidabilità rispetto alla RT-PCR: mentre la seconda è più sensibile ma gravata da un rischio di falsi positivi per la possibile contaminazione del tessuto linfonodale da parte di cellule del tumore primitivo o di epitelii intestinali non neoplastici, la immunoistochimica è più specifica poiché consente di a) distinguere le cellule neoplastiche da quelle non-neoplastiche in base alle loro caratteristiche morfologiche e b) di categorizzare i *clusters* di epitelii tumorali in base alle loro dimensioni (ITC *versus* micro- e macro-metastasi)

Molti lavori pubblicati in letteratura hanno indagato le ITC linfonodali in pazienti pNO con CCR con risultati controversi e inconsistenti sia per quanto riguarda la prevalenza che l'impatto prognostico.

Le motivazioni legate a tale difformità di risultati possono essere ricercate nelle procedure metodologiche non uniformi di differenti gruppi di ricerca che non consentono affidabili paragoni tra i dati pubblicati per: a) l'utilizzo di diversi anticorpi (con diversa sensibilità e specificità) e protocolli di colorazione, b) il diverso numero di linfonodi esaminati e di sezioni esaminate per linfonodo, c) la variabilità di concordanza tra osservatori (*i.e. interobserver agreement*), d) la variabilità numerica dei gruppi studiati e c) la inclusione di carcinomi rettali sottoposti a terapia neo-adiuvante la quale, causando una significativa riduzione del numero delle strutture

linfonodali, può rappresentare un *bias* di selezione e fornire risultati “inquinati” e pertanto non attendibili.

Diversamente da questi (che sono studi condotti su piccoli gruppi di pazienti retrospettivi e in cui micrometastasi e ITC sono spesso considerate insieme), il presente lavoro si distingue per la numerosità del gruppo di studio, la metodologia (consecutiva, prospettica e standardizzata) di collezionamento dei casi, la numerosità di correlazioni statistiche effettuate, nonché per la valutazione della consistenza *inter-observer* nella identificazione delle ITC, testata con *k coefficient* e pari a 0,85.

Questa indagine conferma la frequenza di ITC (200/361 casi= 55,5%; 767/5920 linfonodi= 13%) così come la sua associazione con lo stadio e la invasione neoplastica vascolare già documentate in un precedente lavoro pubblicato da un gruppo di patologi padovani nel 2006 (69).

Aggiuntivamente, i dati acquisiti sull'*outcome* hanno documentato, fra le 36 recidive, una netta prevalenza di casi ITC+vi (29/36=80%) e l'analisi multivariata ha individuato nelle ITC l'unico indicatore prognostico indipendente in grado di influire in maniera negativa sulla recidiva di malattia, confermando così parte dei lavori pubblicati e già citati.

Mentre il numero medio di linfonodi campionati per caso differisce in modo significativo tra il gruppo ITC+vo e quello ITC-vo, esso non differisce tra il gruppo di pazienti andati incontro a recidiva e quelli liberi da malattia. Questo significa che sia i pazienti che hanno sviluppato recidiva che quelli non ricorrenti hanno avuto un adeguato ed equivalente *staging* linfonodale (superiore ai 12 linfonodi raccomandati); tuttavia, per i 7 casi che, pur senza ITC, hanno presentato ritorno di malattia, è possibile ipotizzare che un maggior numero di linfonodi campionati e/o un maggior numero di sezioni esaminate per linfonodo avrebbe potuto identificare ITC “*missed*”.

Ulteriori calcoli e analisi statistiche condotte all'interno del gruppo ITC+vo hanno dimostrato per la prima volta che: a) esiste una associazione tra il rischio di recidiva e il numero di linfonodi ITC+vi; b) tra i 767 linfonodi ITC+vi, quasi il 90% sono localizzati entro 3 cm dalla neoplasia e c) i pazienti ITC+vi andati incontro a recidiva hanno un numero medio di linfonodi ITC+vi entro 3 cm dalla neoplasia significativamente maggiore di quello dei casi ITC+vi non recidivati.

10. CONCLUSIONI

Il presente elaborato fornisce alle conoscenze già acquisite in campo oncologico colo-rettale un contributo di solida valenza scientifica per la impostazione dello studio e la numerosità dei casi considerati; inoltre, supporta e valorizza i risultati dei lavori pubblicati sul significato prognostico delle Cellule Tumorali Isolate e dai quali emerge per metodologia procedurale e rappresentatività del campione studiato.

La importanza di variabili isto-patologiche (quali stadio, invasione vascolare, metastasi linfonodali....), già note per costituire importanti fattori prognostici, è stata confermata.

Aggiuntivamente, è stato dimostrato che le ITC (che, al momento, non hanno alcun peso nel concorrere a determinare lo stadio e, quindi, la prognosi) rappresentano un ulteriore variabile morfologica in grado di identificare, tra il sottogruppo di pazienti con CCR pN0, quelli a maggior rischio di recidiva. È, pertanto, plausibile ipotizzare un loro ruolo nel concorrere a spiegare (almeno in parte) il 20-30% di pazienti pN0 che, pur in assenza di localizzazione linfonodale di malattia, recidivano entro 5 anni.

Da un punto di vista delle implicazioni pratiche, le ITC rappresentano indicatori prognostici clinicamente rilevanti e come tali possono costituire criterio per la selezione di pazienti pN0 a rischio di recidiva da sottoporre a terapia adiuvante (e che, al momento, per questo gruppo di pazienti, non è raccomandata).

11. BIBLIOGRAFIA

1. **Hermanek P**, Hutter RV, Sobin LH, Wittekind C. International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer*. 1999;86:2668-73.
2. **Chiang JM**, Chen MC, Changchien CR, Chen JS, Tang R, Wang JY, Yeh CY, Fan CW, Tsai WS. Favorable influence of age on tumor characteristics of sporadic colorectal adenocarcinoma: patients 30 years of age or younger may be a distinct patient group. *Dis Colon Rectum*. 2003;46:904-10.
3. **Fante R**, Benatti P, di Gregorio C, De Pietri S, Pedroni M, Tamassia MG, Percesepe A, Rossi G, Losi L, Roncucci L, Ponz de Leon M. Colorectal carcinoma in different age groups: a population-based investigation. *Am J Gastroenterol*. 1997;92:1505-9.
4. **Mostafa G**, Matthews BD, Norton HJ, Kercher KW, Sing RF, Heniford BT. Influence of demographics on colorectal cancer. *Am Surg*. 2004;70:259-64.

5. **Savas** N, Dagli U, Akbulut S, Yuksel O, Sahin B. Colorectal cancer localization in young patients: should we expand the screening program? *Dig Dis Sci.* 2007;52:798-802.

6. **Saltzstein** SL, Behling CA. Age and time as factors in the left-to-right shift of the subsite of colorectal adenocarcinoma: a study of 213,383 cases from the California Cancer Registry. *J Clin Gastroenterol.* 2007;41:173-7.

7. **Griffin** PM, Liff JM, Greenberg RS, Clark WS. Adenocarcinomas of the colon and rectum in persons under 40 years old. A population-based study. *Gastroenterology.* 1991;100:1033-40.

8. **Okamoto** M, Shiratori Y, Yamaji Y, Kato J, Ikenoue T, Togo G, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Relationship between age and site of colorectal cancer based on colonoscopy findings. *Gastrointest Endosc.* 2002;55:548-51.

9. **Arai** T, Takubo K, Sawabe M, Esaki Y. Pathologic characteristics of colorectal cancer in the elderly: a retrospective study of 947 surgical cases. *J Clin Gastroenterol.* 2000;31:67-72.

10. **Fazeli** MS, Adel MG, Lebaschi AH. Colorectal carcinoma: a retrospective, descriptive study of age, gender, subsite, stage, and differentiation in Iran from 1995 to 2001 as observed in Tehran University. *Dis Colon Rectum.* 2007 ;50:990-5.

11. **Kim** DH, Shin MH, Ahn YO. Incidence pattern of colorectal cancer in Korea by subsite of origin. *Korean Med Sci.* 2000;15:675-81.

12. **Nawa** T, Kato J, Kawamoto H, Okada H, Yamamoto H, Kohno H, Endo H, Shiratori Y. Differences between right- and left-sided colon cancer in patient characteristics, cancer morphology and histology. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23:418-23.

13. **Erkek** B, Ozkan N, Bayar S, Genc V, Ekrem U, Kuzu A, Aribal D. Subsite distribution of colorectal carcinoma and implications for screening; a retrospective audit of 1771 cases. *Hepatogastroenterology.* 2007;54:77-80.

14. **Ponz de Leon M**, Marino M, Benatti P, Rossi G, Menigatti M, Pedroni M, Di Gregorio C, Losi L, Borghi F, Scarselli A, Ponti G, Roncari B, Zangardi G, Abbati G, Ascari E, Roncucci L. Trend of incidence, subsite distribution and staging of colorectal neoplasms in the 15-year experience of a specialised cancer registry. *Ann Oncol.* 2004 ;15:940-6.

15. **Sarli L**, Michiara M, Sgargi P, Iusco D, De Lisi V, Leonardi F, Bella MA, Sgobba G, Roncoroni L. The changing distribution and survival of colorectal carcinoma: an epidemiological study in an area of northern Italy. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2005;17:567-72.

16. **Gonzalez EC**, Roetzheim RG, Ferrante JM, Campbell R. Predictors of proximal vs. distal colorectal cancers. *Dis Colon Rectum.* 2001;44:251-8.

17. **Alley PG**, McNee RK. Age and sex differences in right colon cancer. *Dis Colon Rectum.* 1986;29:227-9.

18. **Gomez D**, Dalal Z, Raw E, Roberts C, Lyndon PJ. Anatomical distribution of colorectal cancer over a 10 year period in a district

general hospital: is there a true "rightward shift"? *Postgrad Med J.* 2004;80:667-9.

19. **Keating** J, Pater P, Lolohea S, Wickremesekera K. The epidemiology of colorectal cancer: what can we learn from the New Zealand Cancer Registry? *N Z Med J.* 2003;116:U437.

20. **Mitry** E, Benhamiche AM, Jouve JL, Clinard F, Finn-Faivre C, Faivre J. Colorectal adenocarcinoma in patients under 45 years of age: comparison with older patients in a well-defined French population. *Dis Colon Rectum.* 2001;44:380-7.

21. **Green** J, Watson J, Roche M, Beral V, Patnick J. Stage, grade and morphology of tumours of the colon and rectum recorded in the Oxford Cancer Registry, 1995-2003. *Br J Cancer.* 2007;96:140-2.

22. **Linares Santiago** E, Sánchez Calzado JA, Capitán Morales L, Gómez Parra M, González Mariscal MJ, Mendoza Olivares FJ, Sáenz Dana M, Herrerías Gutiérrez JM. Relationship between degree of cellular differentiation in colorectal cancer and topographical distribution. *Rev Esp Enferm Dig.* 2002;94:78-87.

23. **Gervaz P**, Bouzourene H, Cerottini JP, Chaubert P, Benhattar J, Secic M, Wexner S, Givel JC, Belin B. Dukes B colorectal cancer: distinct genetic categories and clinical outcome based on proximal or distal tumor location. *Dis Colon Rectum*. 2001;44:364-72.

24. **Iwatani Y**, Shimada Y, Seima Y, Yamazaki T, Miyazaki N. The biological and clinicopathological characteristics of right-sided colon cancer. *Oncol Rep*. 2000;7:991-4.

25. **Fukatsu H**, Kato J, Nasu JI, Kawamoto H, Okada H, Yamamoto H, Sakaguchi K, Shiratori Y. Clinical characteristics of synchronous colorectal cancer are different according to tumor location. *Dig Liver Dis*. 2007;39: 40-6.

26. **Andreoni B**, Chiappa A, Bertani E, Bellomi M, Orecchia R, Zampino M, Fazio N, Venturino M, Orsi F, Sonzogni A, Pace U, Monfardini L. Surgical outcomes for colon and rectal cancer over a decade: results from a consecutive monocentric experience in 902 unselected patients. *World J Surg Oncol*. 2007;5:73.

27. **Piñol V**, Andreu M, Castells A, Payá A, Bessa X, Jover R; Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association. Synchronous colorectal neoplasms in patients with colorectal cancer: predisposing individual and familial factors. *Dis Colon Rectum*. 2004;47:1192-200.
28. **Langevin JM**, Nivatvongs S. The true incidence of synchronous cancer of the large bowel. A prospective study. *Am J Surg*. 1984;147:330-3.
29. **Schaal JC**, Mondino JC, Paris F, Piat JM, Jaeck D. Synchronous colorectal cancers. *J Chir*. 1991;128:476-80.
30. **Oya M**, Takahashi S, Okuyama T, Yamaguchi M, Ueda Y. Synchronous colorectal carcinoma: clinico-pathological features and prognosis. *Jpn J Clin Oncol*. 2003 ;33:38-43.
31. **Wang HZ**, Huang XF, Wang Y, Ji JF, Gu J. Clinical features, diagnosis, treatment and prognosis of multiple primary colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2004;10:2136-9.

32. **Chen** HS, Sheen-Chen SM. Synchronous and "early" metachronous colorectal adenocarcinoma: analysis of prognosis and current trends. *Dis Colon Rectum*. 2000;43:1093-9.

33. **Ikeda** Y, Saku M, Kawanaka H, Muranaka T, Takeshita M, Watanabe J, Yoshida K, Sugimachi K. Distribution of synchronous and metachronous multiple colorectal cancers. *Hepatogastroenterology*. 2004;51:443-6.

34. **Welch** JP. Multiple colorectal tumors. An appraisal of natural history and therapeutic options. *Am J Surg*. 1981;142:274-80.

35. **Gervaz** P, Bucher P, Neyroud-Caspar I, Soravia C, Morel P. Proximal location of colon cancer is a risk factor for development of metachronous colorectal cancer: a population-based study. *Dis Colon Rectum*. 2005;48:227-32.

36. **Park** IJ, Yu CS, Kim HC, Jung YH, Han KR, Kim JC. Metachronous colorectal cancer. *Colorectal Dis*. 2006;8:323-7.

37. **Ballesté** B, Bessa X, Piñol V, Castellví-Bel S, Castells A, Alenda C, Paya A, Jover R, Xicola RM, Pons E, Llor X, Cordero C, Fernandez-Bañares F, de Castro L, Reñé JM, Andreu M; For the Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association. Detection of metachronous neoplasms in colorectal cancer patients: identification of risk factors. *Dis Colon Rectum*. 2007 ;50:971-80.
38. **Yamazaki** T, Takii Y, Okamoto H, Sakai Y, Hatakeyama K. What is the risk factor for metachronous colorectal carcinoma? *Dis Colon Rectum*. 1997;40:935-8.
39. **Cali** RL, Pitsch RM, Thorson AG, Watson P, Tapia P, Blatchford GJ, Christensen MA. Cumulative incidence of metachronous colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1993;36:388-93.
40. **Mattar** M, Frankel P, David D, Clarke KO, Chu DZ, Jiang C, Yen Y. Clinicopathologic significance of synchronous and metachronous adenomas in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2005;5:274-8.

41. **Slater** G, Fleshner P, Aufses AH Jr. Colorectal cancer location and synchronous adenomas. *Am J Gastroenterol.* 1988;83:832-6.

42. **Hernanz** F, Revuelta S, Redondo C, Madrazo C, Castillo J, Gómez-Fleitas M. Colorectal adenocarcinoma: quality of the assessment of lymph node metastases. *Dis Colon Rectum.* 1994;37:373-6.

43. **Tsai** HL, Lu CY, Hsieh JS, Wu DC, Jan CM, Chai CY, Chu KS, Chan HM, Wang JY. The prognostic significance of total lymph node harvest in patients with T2-4N0M0 colorectal cancer. *J Gastrointest Surg.* 2007;11:660-5.

44. **Kim** J, Huynh R, Abraham I, Kim E, Kumar RR. Number of lymph nodes examined and its impact on colorectal cancer staging. *Am Surg.* 2006;72:902-5.

45. **Chen** SL, Bilchik AJ. More extensive nodal dissection improves survival for stages I to III of colon cancer: a population-based study. *Ann Surg.* 2006;244:602-10.

46. **Sarli L**, Bader G, Iusco D, Salvemini C, Mauro DD, Mazzeo A, Regina G, Roncoroni L. Number of lymph nodes examined and prognosis of TNM stage II colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2005;4:272-9.
47. **Yoshimatsu K**, Ishibashi K, Umehara A, Yokomizo H, Yoshida K, Fujimoto T, Watanabe K, Ogawa K. How many lymph nodes should be examined in Dukes' B colorectal cancer? Determination on the basis of cumulative survival rate. *Hepatogastroenterology*. 2005;52:1703-6.
48. **Cianchi F**, Palomba A, Boddi V, Messerini L, Pucciani F, Perigli G, Bechi P, Cortesini C. Lymph node recovery from colorectal tumor specimens: recommendation for a minimum number of lymph nodes to be examined. *World J Surg*. 2002;26:384-9.
49. **Johnson PM**, Porter GA, Ricciardi R, Baxter NN. Increasing negative lymph node count is independently associated with improved long-term survival in stage IIIB and IIIC colon cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24:3570-5.

50. **Baxter** NN, Virnig DJ, Rothenberger DA, Morris AM, Jessurun J, Virnig BA. Lymph node evaluation in colorectal cancer patients: a population-based study. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:219-25.
51. **Caplin** S, Cerottini JP, Bosman FT, Constanda MT, Givel JC. For patients with Dukes' B (TNM Stage II) colorectal carcinoma, examination of six or fewer lymph nodes is related to poor prognosis. *Cancer*. 1998;83:666-72.
52. **Prandi** M, Lionetto R, Bini A, Francioni G, Accarpio G, Anfossi A, Ballario E, Becchi G, Bonilauri S, Carobbi A, Cavaliere P, Garcea D, Giuliani L, Morziani E, Mosca F, Mussa A, Pasqualini M, Poddie D, Tonetti F, Zardo L, Rosso R. Prognostic evaluation of stage B colon cancer patients is improved by an adequate lymphadenectomy: results of a secondary analysis of a large scale adjuvant trial. *Ann Surg*. 2002;235:458-63.
53. **Berberoglu** U. Prognostic significance of total lymph node number in patients with T1-4N0M0 colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 2004;51:1689-93.

54. **Swanson** RS, Compton CC, Stewart AK, Bland KI. The prognosis of T3N0 colon cancer is dependent on the number of lymph nodes examined. *Ann Surg Oncol*. 2003;10:65-71.

55. **Wong** JH, Severino R, Honnebier MB, Tom P, Namiki TS. Number of nodes examined and staging accuracy in colorectal carcinoma. *J Clin Oncol*. 1999;17:2896-900.

56. **Tepper** JE, O'Connell MJ, Niedzwiecki D, Hollis D, Compton C, Benson AB 3rd, Cummings B, Gunderson L, Macdonald JS, Mayer RJ. Impact of number of nodes retrieved on outcome in patients with rectal cancer. *J Clin Oncol*. 2001;19:157-63.

57. **Goldstein** NS, Sanford W, Coffey M, Layfield LJ. Lymph node recovery from colorectal resection specimens removed for adenocarcinoma. Trends over time and a recommendation for a minimum number of lymph nodes to be recovered. *Am J Clin Pathol*. 1996;106:209-16.

58. **Le Voyer** TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ, Haller DG. Colon cancer survival is associated with

increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089. *J Clin Oncol*. 2003;21:2912-9.

59. **Cserni** G, Vajda K, Tarján M, Bori R, Svébis M, Baltás B. Nodal staging of colorectal carcinomas from quantitative and qualitative aspects. Can lymphatic mapping help staging? *Pathol Oncol Res*. 1999;5:291-6.

60. **Cserni** G, Tarján M, Bori R. Distance of lymph nodes from the tumor: an important feature in colorectal cancer specimens. *Arch Pathol Lab Med*. 2001;125:246-9.

61. **Maurel** J, Launoy G, Grosclaude P, Gignoux M, Arveux P, Mathieu-Daudé H, Raverdy N, Faivre J. Lymph node harvest reporting in patients with carcinoma of the large bowel: a French population-based study. *Cancer*. 1998;82:1482-6.

62. **Horzic** M, Kopljar M. Minimal number of lymph nodes that need to be examined for adequate staging of colorectal cancer-factors influencing lymph node harvest. *Hepatogastroenterology*. 2005;52:86-9.

63. **Ostadi** MA, Harnish JL, Stegienko S, Urbach DR. Factors affecting the number of lymph nodes retrieved in colorectal cancer specimens. *Surg Endosc.* 2007;21:2142-6.
64. **Gelos** M, Gelhaus J, Mehnert P, Bonhag G, Sand M, Philippou S, Mann B. Factors influencing lymph node harvest in colorectal surgery. *Int J Colorectal Dis.* 2008;23:53-9.
65. **Johnson** PM, Malatjalian D, Porter GA. Adequacy of nodal harvest in colorectal cancer: a consecutive cohort study. *J Gastrointest Surg.* 2002;6:883-88.
66. **Baxter** NN, Morris AM, Rothenberger DA, Tepper JE. Impact of preoperative radiation for rectal cancer on subsequent lymph node evaluation: a population-based analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;61:426-31.
67. **Takano** S, Kato J, Yamamoto H, Shiode J, Nasu J, Kawamoto H, Okada H, Shiratori Y. Identification of risk factors for lymph node

metastasis of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 2007;54:746-50.

68. **Chok** KS, Law WL. Prognostic factors affecting survival and recurrence of patients with pT1 and pT2 colorectal cancer. *World J Surg*. 2007;31:1485-90.
69. **Mescoli** C, Rugge M, Pucciarelli S, Russo VM, Pennelli G, Guido M, Nitti D. High prevalence of isolated tumour cells in regional lymph nodes from pN0 colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 2006;59:870-4.
70. **Wasif** N, Faries MB, Saha S, Turner RR, Wiese D, McCarter MD, Shen P, Stojadinovic A, Bilchik AJ. Predictors of occult nodal metastasis in colon cancer: results from a prospective multicenter trial. *Surgery*. 2010;147:352-7.
71. **Tsavellas** G, Patel H, Allen-Mersh TG. Detection and clinical significance of occult tumour cells in colorectal cancer. *Br J Surg*. 2001;88:1307-20.

72. **Feezor** RJ, Copeland EM 3rd, Hochwald SN. Significance of micrometastases in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2002;9:944-53.
73. **Nicastri** DG, Doucette JT, Godfrey TE, Hughes SJ. Is occult lymph node disease in colorectal cancer patients clinically significant? A review of the relevant literature. *J Mol Diagn.* 2007;9:563-71.
74. **Messerini** L, Cianchi F, Cortesini C, Comin CE. Incidence and prognostic significance of occult tumor cells in lymph nodes from patients with stage IIA colorectal carcinoma. *Hum Pathol.* 2006;37:1259-67.
75. **Cutait** R, Alves VA, Lopes LC, et al. Restaging of colorectal cancer based on the identification of lymph node micrometastases through immunoperoxidase staining of CEA and cytokeratins. *Dis Colon Rectum.* 1991;34:917-920.
76. **Haboubi** NY, Clark P, Kaftan SM, Schofield PF. The importance of combining xylene clearance and immunohistochemistry in the accurate staging of colorectal carcinoma. *JR Soc Med.* 1992;85:386-388.

77. **Greenson** JK, Isenhardt CE, Rice R, Mojzisek C, Houchens D, Martin EW Jr. Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Duke's B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. Correlation with long-term survival. *Cancer*. 1994;73:563-569.
78. **Nicholson** AG, Marks CG, Cook MG. Effect on lymph node status of triple leveling and immunohistochemistry with CAM 5.2 on node negative colorectal carcinomas. *Gut*. 1994;35:1447-1448.
79. **Jeffers** MD, O'Dowd GM, Mulcahy H, Stagg M, O'Donoghue DP, Toner M. The prognostic significance of immunohistochemically detected lymph node micrometastases in colorectal carcinoma. *J Pathol*. 1994;172:183-187.
80. **Adell** G, Boeryd B, Franlund B, Sjobahl R, Hakansson L. Occurrence and prognostic importance of micrometastases in regional lymph nodes in Duke's B colorectal carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur J Surg*. 1996;162:637-642.

81. **Broll** R, Schauer V, Schimmelpenning H, et al. Prognostic relevance of occult tumor cells in lymph nodes of colorectal carcinomas: an immunohistochemical study. *Dis Col Rectum*. 1997;40:1465-1471.

82. **Sasaki** M, Watanabe H, Jass JR, et al. Occult lymph node metastases detected by cytokeratin immunohistochemistry predict recurrence in 'node-negative' colorectal cancer. *J Gastroenterol*. 1997;32:758-764.

83. **Haboubi** NY, Abdalla SA, Amini S, Clark P, Dougal M, Dube A, Schofield P. The novel combination of fat clearance and immunohistochemistry improves prediction of the outcome of patients with colorectal carcinomas: a preliminary study. *Int J Colorectal Dis*. 1998;13:99-102.

84. **Oberg** A, Stenling R, Tavelin B, Lindmark G. Are lymph node micrometastases of any clinical significance in Duke's stages A and B colorectal cancer? *Dis Colon Rectum*. 1998;41:1244-1249.

85. **Hitchcock** CL, Sampsel J, Young DC, Martin EW Jr, Arnold MW. Limitations with light microscopy in the detection of colorectal cancer cells. *Dis Colon Rectum*. 1999;42:1046-52.
86. **Nakanishi** Y, Ochiai A, Yamauchi Y, Moriya Y, Yoshimura K, Hirohashi S. Clinical implications of lymph node micrometastases in patients with colorectal cancers. A case control study. *Oncology*. 1999;57:276-80.
87. **Isaka** N, Nozue M, Doy M, Fukao K. Prognostic significance of perirectal lymph node micrometastases in Dukes' B rectal carcinoma: an immunohistochemical study by CAM5.2. *Clin Cancer Res*. 1999;5:2065-8.
88. **Tschmelitsch** J, Klimstra DS, Cohen AM. Lymph node micrometastases do not predict relapse in stage II colon cancer. *Ann Surg Oncol*. 2000;7:601-608.
89. **Clarke** G, Ryan E, O'Keane JC, Crowe J, MacMathuna P. The detection of cytokeratins in lymph nodes of Duke's B colorectal cancer subjects predicts a poor outcome. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2000;12:549-552.

90. **Andreola S**, Leo E, Belli F, Gallino G, Sirizzotti G, Sampietro G. Adenocarcinoma of the lower third of the rectum: metastases in lymph nodes smaller than 5 mm and occult micrometastases; preliminary results on early tumor recurrence. *Ann Surg Oncol*. 2001;8:413-7.
91. **Yasuda K**, Adachi Y, Shiraishi N, Yamaguchi K, Hirabayashi Y, Kitano S. Pattern of lymph node micrometastasis and prognosis of patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2001;8:300-4.
92. **Choi HJ**, Choi YY, Hong SH. Incidence and prognostic implications of isolated tumor cells in lymph nodes from patients with Dukes B colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 2002;45:750-5.
93. **Noura S**, Yamamoto H, Miyake Y, et al. Immunohistochemical assessment of localization and frequency of micrometastases in lymph nodes of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2002;8:759-767.

94. **Fisher** ER, Colangelo L, Wieand S, Fisher B, Wolmark N. Lack of influence of cytokeratin-positive mini micrometastases in "Negative Node" patients with colorectal cancer: findings from the national surgical adjuvant breast and bowel projects protocols R-01 and C-01. *Dis Colon Rectum*. 2003;46:1021-5.
95. **Palma** RT, Waisberg J, Bromberg SH, Simão AB, Godoy AC. Micrometastasis in regional lymph nodes of extirpated colorectal carcinoma: immunohistochemical study using anti-cytokeratin antibodies AE1/AE3. *Colorectal Dis*. 2003;5:164-8.
96. **Bukholm** IRK, Bondi J, Wiik P, et al. Presence of isolated tumor cells in mesenteric lymph nodes predicts poor diagnosis in patients with stage II colon cancer. *EJSO*. 2003;29:862-866.
97. **Shimoyama** M, Yamazaki T, Suda T, Hatakeyama K. Prognostic significance of lateral lymph node micrometastases in lower rectal cancer: an immunohistochemical study with CAM5.2. *Dis Colon Rectum*. 2003;46:333-9.
98. **Kronberg** U, López-Kostner F, Soto G, Zúñiga A, Wistuba I, Miranda V, Pinto E, Viviani P, Marshall G. Detection of lymphatic

micrometastases in patients with stages I and II colorectal cancer: impact on five-year survival. *Dis Colon Rectum*. 2004;47:1151-7.

99. **Rosenberg R**, Friederichs J, Gertler R, Hoos A, Mueller J, Nahrig J, Nekarda H, Siewert JR. Prognostic evaluation and review of immunohistochemically detected disseminated tumor cells in peritumoral lymph nodes of patients with pN0 colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2004;19:430-7.
100. **Fleming FJ**, Hayanga AJ, Glynn F, Thakore H, Kay E, Gillen P. Incidence and prognostic influence of lymph node micrometastases in rectal cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2007;33:998-1002.
101. **Steinert R**, Hantschick M, Vieth M, Gastinger I, Kühnel F, Lippert H, Reymond MA. Influence of subclinical tumor spreading on survival after curative surgery for colorectal cancer. *Arch Surg*. 2008;143:122-8.
102. **Uribarrena-Amezaga R**, Ortego J, Fuentes J, Raventós N, Parra P, Uribarrena-Echevarría R. Prognostic value of lymph node micrometastasis in patients with colorectal cancer in Dukes stages A and B (T1-T4, N0, M0). *Rev Esp Enferm Dig*. 2010;102:176-86.

103. **Jass JR**, Love SB, Northover JM. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet*. 1987;1:1303-6.
104. **Mandard AM**, Dalibard F , Mandard JC, et al. Pathologic assessment of tumor regression grade after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. *Cancer* 1994;73:2680-6.
105. American Joint Committee on Cancer. In: Green FL, editor. AJCC cancer staging manual. 6th ed. New York: Springer; 2002.
106. International Union Against Cancer (UICC). In: Sobin LH, Wittekind C, editors. TNM classification of malignant tumors. 6th ed. New York: Wiley; 2002.
107. World Health Organization. International Classification of Cancer Diseases for Oncology. Geneva, Switzerland: WHO, 1990.

108. **Faivre J**, Bédenne L, Boutron MC, Milan C, Collonges R, Arveux P. Epidemiological evidence for distinguishing subsites of colorectal cancer. *J Epidemiol Community Health*. 1989;43:356-61.

109. **Wu X**, Cokkinides V, Chen VW, Nadel M, Ren Y, Martin J, Ellison GL. Associations of subsite-specific colorectal cancer incidence rates and stage of disease at diagnosis with county-level poverty, by race and sex. *Cancer*. 2006;107:1121-7.

110. **Hamilton SR**, Aaltonen LA (eds) 2000. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Digestive System. Lyon: IARC Press.

111. **Moertel CG**, Barga JA, Dockerty MB. Multiple carcinomas of the large intestine: a review of the literature and a study of 261 cases. *Gastroenterology*. 1958;34:85-98.

112. **Cunliffe WJ**, Hasleton PS, Tweedle DE, Schofield PF. Incidence of synchronous and metachronous colorectal carcinoma. *Br J Surg*. 1984;71:941-3.

