



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

Corso di Laurea magistrale in Biologia

Curriculum Biomedico – Biomolecolare

TESI DI LAUREA

***Biopsia liquida e genomica tumorale per la personalizzazione
terapeutica nei pazienti affetti da tumore del colon in stadio II/III***

Candidata: MICHELA CONSOLANDI

Relatrice: Prof.ssa LUIGIA GRAZIA FRESU

Stage svolto presso l'Ente ASL Biella

Correlatrice: Dott.ssa CRIVELLI FRANCESCA

Responsabile Ente: Dott. LEONE FRANCESCO

Anno Accademico 2024/ 2025



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

Corso di Laurea magistrale in Biologia

Curriculum Biomedico – Biomolecolare

TESI DI LAUREA

***Biopsia liquida e genomica tumorale per la personalizzazione
terapeutica nei pazienti affetti da tumore del colon in stadio II/III***

Candidata: MICHELA CONSOLANDI *Michele Consolandi*

Relatrice: Prof.ssa GRAZIA LUIGIA FRESU

Grazia Fresu

Stage svolto presso l'Ente ASL Biella

Francesca Crivelli

Correlatrice: Dott.ssa CRIVELLI FRANCESCA

Francesco Leone

Responsabile Ente: Dott. LEONE FRANCESCO

Anno Accademico 2024/ 2025

Sommario

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Carcinoma del colon-retto	1
1.1.1 Epidemiologia	1
1.1.2 Dall'epidemiologia alla necessità di biomarcatori molecolari	4
1.1.3 Eziologia	4
1.1.3.1 Importanza dello stile di vita e della dieta nell'insorgenza del CRC	6
1.1.3.2 Microbiota intestinale	6
1.1.4 Patogenesi	7
1.1.5 Stadiazione del CRC	10
1.1.6 Trattamenti del tumore del colon	11
1.1.6.1 Limiti della terapia adiuvante con oxaliplatino: tossicità e overtreatment	14
1.2 Biopsia liquida	16
1.2.1 DNA tumorale circolante: ctDNA	19
1.2.2 MRD: malattia residua minima	21
1.3 Sagittarius	24
1.3.1 Disegno dello studio	26
1.3.1.1 Popolazione	27
1.3.1.2 Tossicità farmacologiche e gestione delle modifiche di dose nel protocollo	29
1.3.1.3 Timeline ed Endpoint	30
1.4 Ricerca clinica	32
1.4.1 Metodologia e sviluppo dei trial clinici sperimentali	32
1.4.2 Organizzazione e conduzione dello studio clinico	34
1.4.3 Aspetti etici e Good Clinical Practice (GCP)	35
1.4.4 Normativa della ricerca clinica	36
1.4.5 Ruolo della ricerca clinica nella medicina traslazionale	37
2. SCOPO	39
3. MATERIALI e METODI	40
3.1 Procedure di screening	40
3.1.1 Criteri di eleggibilità	40
3.1.2 Consenso informato	41
3.1.3 Screening molecolare	43
3.1.4 Comprehensive Genomic Profiling del tessuto tumorale	45
3.1.5 Costruzione del test tumor-informed	47
3.1.6 Cellule mononucleate del sangue periferico: PBMC	48
3.1.7 Campione fecale e tampone buccale	49

3.2 Randomizzazione	52
3.3 Struttura dello studio: Trial-1 e Trial-2	54
3.4 Case report form	56
3.5 Esami clinici.....	57
3.5.1 Radiologia.....	58
3.5.2 Colonscopia	59
3.5.3 Antigene carcinoembrionale (CEA).....	59
3.6 Questionari e diari.....	59
3.7 Valutazione della sicurezza	61
4. RISULTATI	63
4.1 Screening failures	64
4.2 Stadiazione	65
4.3 Andamento longitudinale della biopsia liquida	67
4.4 Popolazione del Trial-1.....	69
4.5 Popolazione del Trial-2.....	70
4.6 Eventi avversi relati a terapia	73
4.7 Caso di evento avverso serio (SAE)	75
4.8 Caso di reazione avversa da infusione	75
4.9 Caso di sieroconversione e recidiva	76
5. DISCUSSIONE	77
6. CONCLUSIONE	81
7. BIBLIOGRAFIA.....	84

1. INTRODUZIONE

1.1 Carcinoma del colon-retto

1.1.1 Epidemiologia

Secondo i dati pubblicati dall'International Agency for Research on Cancer, il carcinoma del colon-retto è attualmente il terzo tumore più diagnosticato e la seconda causa di morte per cancro a livello mondiale. Come riportato da *Arnold et al.*, si osserva una maggiore incidenza nei Paesi ad alto reddito, in particolare in Europa, Nord America e Australia, mentre tassi inferiori sono registrati in molte regioni dell'Africa e dell'Asia, sebbene in queste ultime si stia assistendo a un progressivo incremento dei casi. Tale tendenza è stata messa in relazione con la progressiva occidentalizzazione degli stili di vita, caratterizzata da diete ipercaloriche, ridotta attività fisica e aumento della prevalenza di obesità. In particolare, i paesi a reddito medio-alto hanno registrato le percentuali più alte di incidenza, 45,94%, e mortalità, 49,37%. Nei paesi ad alto reddito, l'incidenza è risultata leggermente inferiore, 42,43%, rispetto a quelli a reddito medio-alto; tuttavia, la mortalità è stata significativamente più bassa, 36,40%, probabilmente grazie a migliori strutture sanitarie e opzioni terapeutiche avanzate. Complessivamente, i paesi ad alto reddito e quelli a reddito medio-alto rappresentano rispettivamente oltre l'88% e l'85% dell'incidenza e della mortalità del CRC a livello globale.

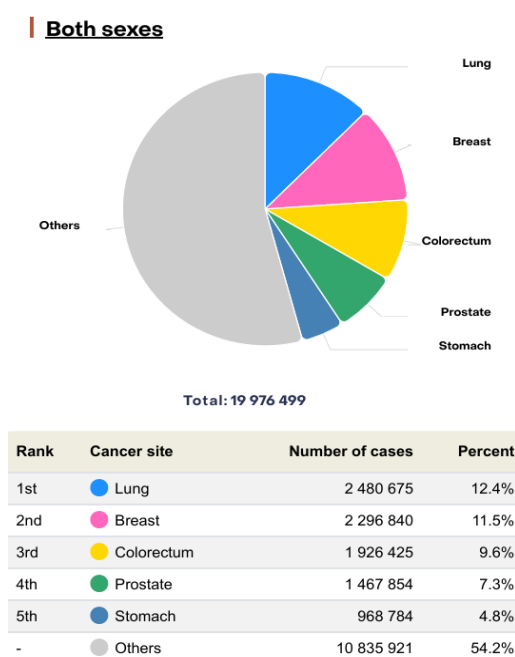


Figura 1. Stime globali di casi di tumore (da GLOBOCAN Global Cancer Observatory -GCO, 2022)

Le stime globali più recenti indicano che, nel 2022, nel mondo sono stati diagnosticati circa 1.926.000 nuovi casi di tumore del colon-retto (*Figura 1*) e si sono verificati oltre 900.000 decessi correlati, contribuendo circa del 10% al numero totale delle nuove diagnosi oncologiche annuali a livello globale [1,2,3].

In Europa, il carcinoma del colon-retto rappresenta una delle neoplasie più frequenti sia negli uomini sia nelle donne. I dati epidemiologici mostrano un’incidenza leggermente maggiore nel sesso maschile, sebbene la differenza di genere tenda a ridursi nelle fasce di età più avanzate [4].

Nel contesto italiano, secondo le stime dei registri tumori nazionali, il carcinoma del colon-retto costituisce una delle principali cause di diagnosi oncologica, con decine di migliaia di nuovi casi ogni anno, confermandosi tra le prime cause di morte oncologica [5]. Secondo le stime nazionali riportate per il 2024, in Italia si attendono circa 48.706 nuove diagnosi, con distribuzione di circa 27.473 casi negli uomini e 21.233 nelle donne (*Tabella 1*). La sopravvivenza a cinque anni dalla diagnosi è stimata intorno al 65% negli uomini e al 66% nelle donne, mentre la prevalenza risulta elevata, con oltre 442.000 persone viventi dopo una diagnosi di tumore del colon-retto, dato che riflette sia l’ampia diffusione della malattia sia il miglioramento delle strategie diagnostico-terapeutiche e di follow-up (FU). Il peso epidemiologico nazionale si inserisce dunque in un quadro in cui la riduzione della mortalità procede parallelamente all’aumento del numero di persone che convivono con la diagnosi, rendendo centrali gli aspetti di sorveglianza, stratificazione prognostica e appropriatezza terapeutica [6].

COLON-RETTO	
Incidenza	Nel 2024 sono state stimate circa 48.706 nuove diagnosi (uomini = 27.473; donne = 21.233)
Mortalità	Nel 2022 sono stimati 24.200 decessi (uomini = 13.000; donne = 11.200) Le stime per il 2023 non sono disponibili
Sopravvivenza netta a 5 anni dalla diagnosi	65% negli uomini e 66% nelle donne
Probabilità di vivere ulteriori 4 anni condizionata ad aver superato il primo anno dopo la diagnosi	77% negli uomini e 79% nelle donne
Prevalenza	Sono 442.600 le persone viventi in Italia dopo una diagnosi di tumore del colon retto (uomini = 227.600; donne = 215.000)

Tabella 1. I numeri del cancro in Italia 2025- (da Oncologia Medica, Comprehensive Cancer Centre, AUSL-IRCCS di Reggio Emilia” Carmine Pinto)

Dal punto di vista temporale, l'introduzione e la diffusione dei programmi di screening basati su ricerca del sangue occulto nelle feci e colonscopia hanno determinato una riduzione della mortalità nei Paesi che hanno adottato strategie di prevenzione secondaria strutturate. Come riportato da diverse analisi longitudinali, la diagnosi precoce consente infatti l'identificazione di lesioni preneoplastiche o di tumori in stadio iniziale, migliorando significativamente la sopravvivenza globale [7]. Nonostante ciò, una quota rilevante di pazienti viene ancora diagnosticata in stadio avanzato, evidenziando la necessità di strumenti aggiuntivi di stratificazione del rischio e monitoraggio della malattia. Inoltre, negli ultimi anni, diversi studi epidemiologici hanno segnalato un aumento dell'incidenza nei soggetti più giovani, al di sotto dei 50 anni, un fenomeno che ha suscitato crescente attenzione nella comunità scientifica e che potrebbe essere correlato a cambiamenti ambientali e comportamentali precoci [8].

Per quanto riguarda le proiezioni, i modelli statistico-epidemiologici globali suggeriscono che l'impatto del carcinoma del colon-retto aumenterà in modo significativo nei prossimi decenni. Stime basate su Globocan indicano che, mantenendo l'attuale andamento demografico ed epidemiologico, entro il 2040 i nuovi casi annuali potrebbero raggiungere circa 3,2 milioni e i decessi circa 1,6 milioni, con un incremento particolarmente marcato nei Paesi in transizione economica, dove il cambiamento degli stili di vita si associa a minore copertura di screening. In modo complementare, modelli più conservativi, che ipotizzano tassi di incidenza invariati rispetto al 2022, prevedono comunque un incremento dei nuovi casi globali entro il 2050, legato principalmente alla crescita e all'invecchiamento della popolazione. In Italia, studi di stima prospettica hanno suggerito che nel 2025 il carcinoma colon-rettale sarebbe rimasto tra le sedi tumorali più frequenti, con un numero di nuove diagnosi che, considerando entrambi i sessi, si attesta su decine di migliaia di casi e un peso rilevante in termini di assistenza sanitaria e organizzazione dei percorsi di cura [9,10,11].

Nel complesso, questi dati delineano uno scenario in cui il carcinoma del colon-retto, pur beneficiando dei risultati ottenuti con lo screening e con l'evoluzione delle terapie, continuerà a rappresentare una sfida oncologica prioritaria. In tale contesto, la necessità di migliorare la stratificazione del rischio, ridurre l'eterogeneità decisionale e limitare il sovratrattamento nelle forme potenzialmente guaribili rendono particolarmente rilevante l'integrazione di biomarcatori molecolari nel percorso clinico, aprendo in modo naturale la discussione sull'utilità di approcci innovativi come la biopsia liquida.

1.1.2 Dall'epidemiologia alla necessità di biomarcatori molecolari

Come emerge dai dati epidemiologici e clinici, l'andamento del CRC risulta fortemente eterogeneo anche tra pazienti inquadrati nello stesso stadio clinico-patologico, suggerendo che la stadiazione tradizionale non sia sempre in grado di riflettere la reale aggressività biologica del tumore [12].

Questa eterogeneità epidemiologica e prognostica trova una spiegazione nella complessità biologica della malattia. Studi di caratterizzazione molecolare hanno dimostrato come il carcinoma del colon-retto comprenda sottotipi biologicamente distinti, associati a differenti traiettorie evolutive e risposte al trattamento [13] che verranno approfonditi nel paragrafo *1.1.4 Patogenesi*. Come riportato da analisi di consenso sui sottotipi molecolari, pazienti con tumori apparentemente simili dal punto di vista istopatologico possono presentare profili molecolari profondamente diversi, con conseguenze cliniche rilevanti. Tali evidenze sottolineano i limiti di un approccio terapeutico standardizzato e sottolineano la necessità di strumenti capaci di intercettare la variabilità biologica individuale, come verrà approfondito nello studio Sagittarius.

1.1.3 Eziologia

Il carcinoma del colon-retto è una patologia a eziologia multifattoriale, il cui sviluppo deriva dall'interazione complessa tra fattori genetici, ambientali, comportamentali e biologici. Tra i fattori modificabili rientrano abitudini alimentari scorrette, obesità, sedentarietà, fumo di tabacco e consumo moderato o elevato di alcol, mentre tra i fattori non modificabili figurano l'età, il sesso e la predisposizione genetica.

Dal punto di vista epidemiologico (*Figura 2*), il CRC si manifesta in due forme principali: ereditaria e sporadica. In letteratura è riportato che la maggioranza dei casi, circa 70%, sono sporadici, ossia si sviluppano in individui senza una storia familiare significativa o una sindrome genetica nota, come risultato dell'accumulo di mutazioni somatiche legate all'età, all'ambiente o agli stili di vita [14].

Una quota di circa il 20% dei casi presenta familiarità, intesa come aggregazione familiare di CRC o adenomi, anche in assenza di una causa genetica mendeliana ben definita. Questa categoria comprende quei pazienti che hanno un rischio aumentato probabilisticamente in base

alla storia familiare, ma per i quali non è stata identificata una variante genetica ad alta penetranza [15].

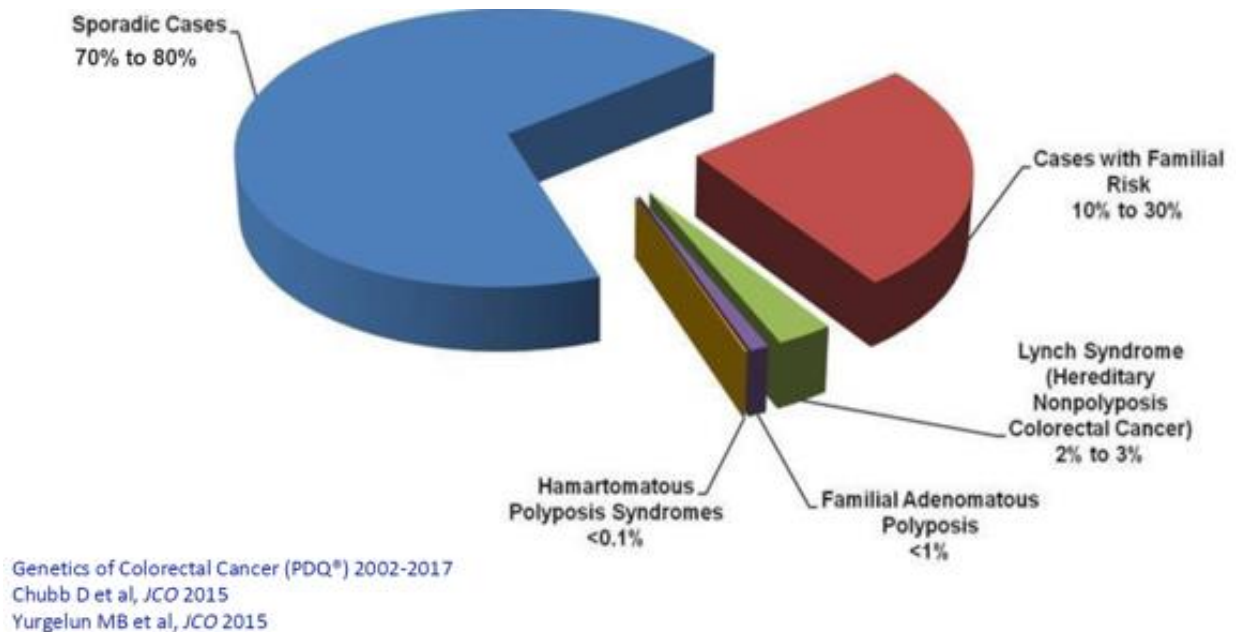


Figura 2. Genetica del cancro del colon-retto (PDQ®) (dal National Cancer Institute (NCI), 2017)

Infine, solo una piccola percentuale, generalmente il 10%, dei tumori coloretali è associata a sindromi genetiche ereditarie ben caratterizzate. Tra queste, le più note sono:

- Sindrome di Lynch (HNPCC, Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer) dovuta a mutazioni nei geni del sistema di riparazione del DNA (MMR genes), responsabile di un aumento significativo del rischio di CRC e di altri tumori extracolonici,
- Poliposi adenomatosa familiare (FAP) causata da mutazioni nel gene APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), caratterizzata dalla formazione di numerosi polipi adenomatosi nel colon e nel retto, con un rischio elevato di progressione verso il carcinoma,

entrambe causate da mutazioni germinali in geni predisponenti al cancro.

1.1.3.1 Importanza dello stile di vita e della dieta nell'insorgenza del CRC

Il CRC rappresenta una delle neoplasie maggiormente influenzate dallo stile di vita. Le evidenze epidemiologiche e molecolari indicano che una quota rilevante dei casi è attribuibile a fattori ambientali e comportamentali potenzialmente modificabili. Secondo le valutazioni aggiornate del World Cancer Research Fund e dell'American Institute for Cancer Research (WCRF/AICR), l'attività fisica regolare è associata a una riduzione significativa del rischio di carcinoma del colon, con una stima di diminuzione relativa compresa tra il 20% e il 25% nei soggetti fisicamente attivi rispetto a quelli sedentari [16].

Anche la dieta influenza il rischio di neoplasia coloretale. Un elevato consumo di fibre, frutta, verdura e cereali integrali è associato a un minor rischio di CRC, grazie all'azione protettiva delle fibre, che riducono il tempo di transito intestinale e, attraverso la fermentazione batterica, producono acidi grassi a catena corta (acetato, propionato e butirato) con effetti antinfiammatori e antiproliferativi. Frutta e verdura contribuiscono inoltre con composti bioattivi, quali polifenoli, flavonoidi, vitamine e minerali, dotati di potenziale azione anticancerogena [17].

Al contrario, il consumo di carni rosse e processate è associato a un aumento del rischio di CRC, stimato intorno al 20% per ogni incremento di 100 g/die di carne rossa o 50 g/die di carne processata. Tale associazione è attribuita alla produzione di metaboliti pro-infiammatori come TMA e TMAO derivati da colina e carnitina, nonché alla formazione di ammine eterocicliche, idrocarburi aromatici policiclici, composti N-nitrosi e acidi biliari secondari, tutti implicati nei processi di carcinogenesi coloretale [18,19].

Anche il fumo di tabacco e l'eccessivo consumo di alcol sono considerati fattori di rischio per la neoplasia coloretale. È stato osservato un aumento del 60% del rischio di CRC nei fumatori, con associazione alle forme tumorali che presentano MSI. Si stima che il consumo di alcool incrementi il rischio d'insorgenza di CRC del 20% se moderato, ma fino al 50% se elevato [20].

1.1.3.2 Microbiota intestinale

Il microbiota intestinale rappresenta un ecosistema altamente complesso costituito da migliaia di specie microbiche, comprendenti batteri, virus, miceti, archea e protozoi, che nel loro insieme contribuiscono in modo determinante al mantenimento dell'omeostasi mucosale e sistemica. In condizioni fisiologiche, l'interazione tra microbiota e ospite si configura come una relazione mutualistica, nella quale la comunità microbica partecipa attivamente al metabolismo dei

nutrienti, alla produzione di metaboliti bioattivi come gli acidi grassi a corta catena, al mantenimento dell'integrità della barriera epiteliale e alla modulazione delle risposte immunitarie innate e adattative [21].

Quando tale equilibrio viene compromesso si instaura una condizione definita disbiosi, caratterizzata da alterazioni qualitative e quantitative della composizione microbica e da modificazioni funzionali del microbioma intestinale. La disbiosi è stata progressivamente riconosciuta come un fattore rilevante nella patogenesi del CRC, in quanto può favorire uno stato di infiammazione cronica di basso grado, aumentare la permeabilità della barriera mucosale e promuovere la produzione di metaboliti genotossici o pro-oncogeni [58]. In generale, nei pazienti si osserva una minore diversità e ricchezza batterica. Inoltre, il microbiota intestinale dei pazienti risulta alterato anche in presenza di adenomi. Quindi, le diverse fasi di cancerogenesi risultano correlate a specifiche variazioni del microbiota, che possono essere utilizzate come biomarcatori per lo screening di CRC [22].

Nel microbiota intestinale fisiologico i phyla batterici predominanti sono Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria, che nel loro insieme contribuiscono alla stabilità metabolica e immunologica dell'ecosistema intestinale. Alcune specie batteriche però risultano associate all'insorgenza e alla progressione del CRC e tra queste si hanno *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis* enterotossigeno ed alcuni ceppi di *Escherichia coli* produttori di colibactina.

1.1.4 Patogenesi

Il carcinoma del CRC origina da una crescita aberrante e non regolata delle cellule epiteliali, conseguente all'accumulo progressivo di alterazioni genetiche ed epigenetiche che compromettono i meccanismi di controllo della proliferazione, dell'apoptosi e della stabilità genomica. La progressione della malattia può culminare nella disseminazione metastatica, evento che si verifica quando le cellule neoplastiche acquisiscono capacità invasive, penetrano nel circolo ematico o linfatico e colonizzano organi distanti rispetto alla sede primaria. Il CRC costituisce pertanto un paradigma di neoplasia a sviluppo multistep, come rappresentato in *Figura 3*, in cui la trasformazione dell'epitelio intestinale normale in carcinoma invasivo richiede l'accumulo coordinato di alterazioni a carico di oncogeni, geni oncosoppressori e geni deputati alla riparazione del DNA [23].

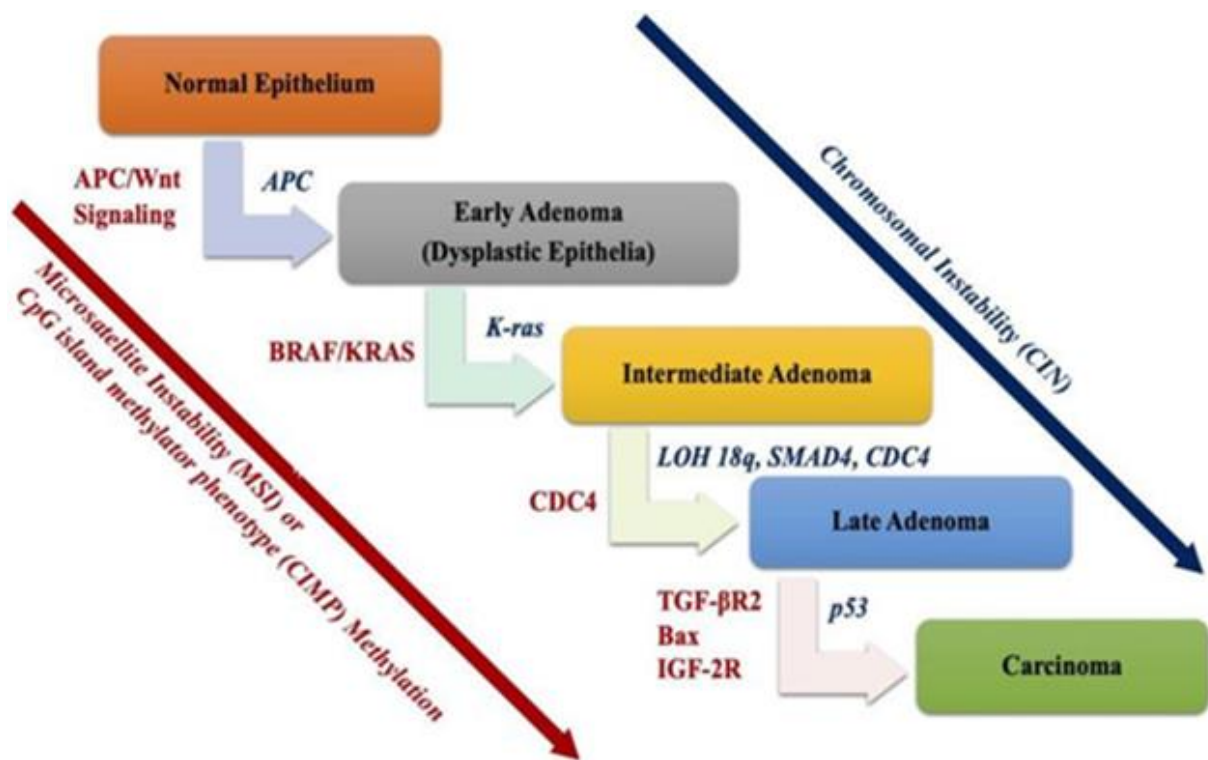


Figura 3. Modello genetico multistep che descrive lo sviluppo del CRC (da Dekker et al., 2022)

Nel modello classico di progressione adenoma-carcinoma, descritto originariamente lungo la via dell'instabilità cromosomica (CIN), l'evento iniziale più frequente è la perdita di funzione del gene APC, che comporta un'attivazione aberrante della via Wnt/ β -catenina, con accumulo nucleare di β -catenina e trascrizione di geni coinvolti nella proliferazione e nella progressione tumorale. A questa alterazione iniziale seguono frequentemente mutazioni attivanti di KRAS e, nelle fasi più avanzate, l'inattivazione di TP53, insieme a perdite di eterozigosi del braccio cromosomico 18q e alterazioni di geni della via del TGF- β , come SMAD2 e SMAD4 [24]. La via CIN, presente nella maggioranza dei carcinomi coloretali sporadici, è caratterizzata da acquisizione o perdita di interi cromosomi o ampie regioni cromosomiche, e rappresenta un modello di progressione graduale sostenuta dall'accumulo quantitativo e qualitativo di alterazioni genetiche.

In questo contesto, le mutazioni di KRAS assumono un ruolo cruciale come eventi che consolidano il vantaggio proliferativo. KRAS codifica una piccola GTPasi coinvolta nella trasduzione del segnale a valle del recettore EGFR. Le mutazioni attivanti, più frequentemente

localizzate nei codoni 12, 13 e 61, determinano una forma costitutivamente attiva della proteina, indipendente dallo stimolo recettoriale, con attivazione persistente delle vie MAPK/ERK e PI3K/AKT. Questo stato di attivazione continua promuove proliferazione, sopravvivenza cellulare e progressione verso il carcinoma invasivo. Alterazioni analoghe a carico di NRAS, sebbene meno frequenti, producono un effetto biologico sovrapponibile, mantenendo attiva la cascata MAPK in maniera autonoma. In assenza di mutazioni KRAS^{wt} e NRAS^{wt}, la via rimane invece regolabile a monte, salvo l'intervento di alterazioni downstream [25].

A valle di RAS si colloca BRAF, chinasi serina/treonina che rappresenta un ulteriore snodo critico della via MAPK. La mutazione V600E comporta un'attivazione costitutiva della proteina e una stimolazione persistente del segnale proliferativo indipendente dall'attività di RAS. Nel CRC, BRAF^{mut} è frequentemente associata a un percorso di carcinogenesi alternativo, noto come serrated pathway, caratterizzato da lesioni serrate e spesso correlato al fenotipo metilatore delle isole CpG (CIMP) e all'ipermetilazione del promotore di MLH1. Tale meccanismo epigenetico conduce alla perdita di espressione di MLH1 e al conseguente deficit del sistema di mismatch repair (MMR), configurando un sottogruppo di tumori con instabilità dei microsatelliti [26].

L'instabilità dei microsatelliti (MSI) rappresenta infatti un secondo grande percorso molecolare nella patogenesi del CRC, riscontrato in circa il 15% dei casi sporadici e nella quasi totalità dei tumori associati alla sindrome di Lynch [27]. Il sistema MMR, costituito principalmente dalle proteine MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2, è deputato alla correzione degli errori di appaiamento e delle piccole inserzioni o delezioni che si verificano durante la replicazione del DNA. La sua inattivazione, per mutazioni germinali o per ipermetilazione del promotore di MLH1, determina l'accumulo di errori nei microsatelliti, brevi sequenze ripetute particolarmente suscettibili a slittamenti replicativi, con conseguente comparsa di mutazioni frameshift in geni coinvolti nel controllo della crescita cellulare [28]. I tumori MSI-H sono caratterizzati da elevato carico mutazionale, intensa infiltrazione linfocitaria e minore frequenza di mutazioni in APC e TP53 rispetto ai tumori MSS [29].

Accanto ai difetti del MMR, un ulteriore meccanismo di instabilità genomica è rappresentato dalle mutazioni nel dominio esonucleasico di POLE. POLE codifica la DNA polimerasi ϵ , enzima chiave nella replicazione del filamento leading e dotato di attività di proofreading. Le mutazioni patogenetiche in tale dominio compromettono la capacità correttiva dell'enzima, determinando un fenotipo ultramutato con tumor mutational burden estremamente elevato [30].

Questo sottotipo si distingue sia dai tumori MSI-H sia da quelli CIN, pur condividendo con i primi l'elevato numero di mutazioni somatiche. L'abbondanza di neoantigeni generati può favorire una marcata risposta immunitaria intratumorale [31,32], delineando un profilo biologico specifico all'interno della classificazione molecolare del CRC.

Infine, oltre alle mutazioni puntiformi che attivano costitutivamente la cascata MAPK, la carcinogenesi coloretale può essere sostenuta da amplificazioni di recettori tirosin-chinasici, in particolare HER2 (ERBB2). HER2 appartiene alla famiglia dei recettori dell'EGFR e, quando amplificato, determina una sovraespressione recettoriale e un'attivazione persistente delle vie MAPK e PI3K/AKT [33]. Le amplificazioni di HER2 identificano un sottogruppo molecolare distinto, spesso mutuamente esclusivo rispetto alle mutazioni di KRAS, NRAS e BRAF, suggerendo modalità alternative di attivazione dei circuiti proliferativi. In questi casi, la crescita tumorale può essere sostenuta da un meccanismo di "bypass" recettoriale che converte comunque sull'attivazione delle medesime vie intracellulari [34,35].

Nel loro insieme, questi percorsi delineano una rete complessa ma coerente di eventi molecolari che convergono sull'alterazione dei principali nodi regolatori della proliferazione, della sopravvivenza e della stabilità genomica. La comprensione integrata di tali meccanismi non solo chiarisce la patogenesi del carcinoma coloretale, ma costituisce il fondamento biologico per la stratificazione molecolare e per l'applicazione di strategie terapeutiche mirate nella pratica clinica.

1.1.5 Stadiazione del CRC

Secondo le linee guida dell'Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM), la stadiazione del carcinoma del colon si basa sul sistema TNM dell'AJCC/UICC 8^a edizione, che rappresenta il riferimento internazionale per la classificazione anatomica della malattia (*Tabella 2*).

Tale sistema valuta tre parametri fondamentali:

- Estensione del tumore primitivo (T). Descrive la profondità di infiltrazione della parete intestinale e delle strutture adiacenti, variando dal carcinoma in situ fino alle forme che invadono la sierosa o organi contigui;
- Coinvolgimento dei linfonodi regionali (N). Definisce il numero di linfonodi metastatici, distinguendo tra assenza di interessamento e coinvolgimento

progressivamente più esteso, con raccomandazione di analizzare almeno 12 linfonodi per una corretta stadiazione patologica;

- Presenza di metastasi a distanza (M).

Secondo le linee guida ESMO [36], i tumori saranno considerati di stadio II ad alto rischio quando si verifica una delle seguenti condizioni:

- Stadio pT4;
- Campionamento dei linfonodi <12
- ≥ 2 delle seguenti condizioni:
 - grado istologico 3,
 - invasione vascolare,
 - invasione linfatica,
 - invasione perineurale,
 - presentazione del tumore con ostruzione,
 - livelli preoperatori di CEA > 5 mg/ml.

Stadio	Descrizione
Stadio 0	Tis N0M0
Stadio I	T1N0M0
	T2N0M0
Stadio IIa	T3N0M0
Stadio IIb	T4aN0M0
Stadio IIc	T4bN0M0
Stadio IIIa	T1-2, N1a-c, M0
	T1, N2a, M0
Stadio IIIb	T3, T4a, N1a-c, M0
	T2-3, N2a, M0
	T1-2, N2b, M0
Stadio IIIc	T4a, N2a, M0
	T3-T4a, N2b, M0
	T4b, N1-2, M0

Tabella 2. Stadiazione cancro colon. Linee guida AIOM, 2024

1.1.6 Trattamenti del tumore del colon

Il trattamento del carcinoma del colon si fonda su un approccio multimodale che integra chirurgia, chemioterapia, radioterapia, terapie biologiche e immunoterapia, modulato in funzione dello stadio di malattia e, sempre più, del profilo molecolare del tumore. L'evoluzione

delle conoscenze biomolecolari ha progressivamente trasformato la gestione terapeutica, rendendo imprescindibile la caratterizzazione genetica e molecolare per una corretta stratificazione prognostica e predittiva [37]. In questo scenario, la classificazione anatomica rappresenta solo il primo livello decisionale, mentre l'identità biologica del tumore assume un ruolo determinante nella scelta delle strategie terapeutiche.

Nelle forme localizzate, la resezione chirurgica con adeguata linfadenectomia costituisce il trattamento di riferimento. Tuttavia, nei pazienti in stadio III e in quelli in stadio II ad alto rischio, il rischio di micrometastasi subcliniche giustifica l'impiego della chemioterapia adiuvante, finalizzata all'eradicazione della eventuale malattia residua non rilevabile clinicamente. I regimi terapeutici più impiegati prevedono l'associazione di una fluoropirimidina e oxaliplatino, come nel caso del FOLFOX, composto da 5-fluorouracile con acido folinico e oxaliplatino, o del CAPOX, composto da capecitabina più oxaliplatino. La durata del trattamento varia generalmente tra tre e sei mesi, in funzione del profilo di rischio del paziente [38]. Già in questo setting, la biologia tumorale condiziona la scelta terapeutica: i tumori dMMR/MSI-H in stadio II non sembrano trarre beneficio dalla monoterapia con fluoropirimidine, configurando uno dei primi esempi di medicina personalizzata applicata al carcinoma coloretale [39].

In stadi più avanzati della malattia, il ruolo della stratificazione molecolare diviene ancora più centrale. Nella fase metastatica, infatti, la definizione del profilo genomico rappresenta un passaggio obbligato prima dell'avvio del trattamento sistemico. La chemioterapia combinata con oxaliplatino o irinotecan (FOLFOX, FOLFIRI) rimane il cardine terapeutico, ma l'integrazione con farmaci biologici è guidata dalle caratteristiche molecolari del tumore. Le terapie anti-angiogeniche, come bevacizumab, agiscono bloccando il VEGF-A e inibendo la neoangiogenesi tumorale [40], mentre l'identificazione dello stato mutazionale dei geni RAS è imprescindibile per l'impiego degli anticorpi anti-EGFR. Nei tumori RAS wild-type, in particolare del colon sinistro, cetuximab o panitumumab determinano un significativo miglioramento della sopravvivenza; al contrario, la presenza di mutazioni di KRAS o NRAS comporta una resistenza primaria, rendendo inefficace tale strategia [41].

Un ulteriore avanzamento è rappresentato dall'immunoterapia nei tumori MSI-H/dMMR metastatici. In questo sottogruppo biologicamente definito, l'elevato carico mutazionale aumenta l'immunogenicità tumorale, rendendo efficace il trattamento con inibitori dei checkpoint immunitari, quali pembrolizumab o la combinazione nivolumab-ipilimumab. Lo

studio KEYNOTE-177 ha dimostrato la superiorità dell'immunoterapia rispetto alla chemioterapia in prima linea nei tumori MSI-H metastatici, consolidando il paradigma secondo cui la classificazione molecolare non ha solo valore prognostico, ma orienta direttamente la scelta terapeutica [42].

La medicina di precisione ha inoltre identificato ulteriori sottogruppi targetizzabili: nei tumori con mutazione BRAF V600E, l'associazione di encorafenib e cetuximab ha mostrato beneficio clinico; nei tumori con amplificazione di HER2 o fusioni di NTRK, specifiche terapie mirate possono essere utilizzate in contesti selezionati [43]. L'emergere di trattamenti tumor-agnostic conferma come l'identità molecolare tenda progressivamente a superare la sola classificazione anatomica nella definizione delle strategie terapeutiche.

Alla luce di queste evidenze maturate nel setting metastatico, si è sviluppata l'ipotesi di trasferire l'approccio molecolare anche nelle fasi precoci di malattia. In particolare, l'impiego della biopsia liquida per identificare la malattia molecolare residua (MRD) dopo chirurgia potrebbe consentire di selezionare i pazienti realmente a rischio di recidiva, nei quali testare strategie più efficaci rispetto alla chemioterapia adiuvante standard. L'obiettivo è superare l'attuale modello basato esclusivamente su criteri clinico-patologici, introducendo una stratificazione dinamica fondata sulla biologia tumorale.

Numerosi trattamenti target e immunoterapici, già validati nel carcinoma coloretale metastatico (mCRC), rappresentano potenziali candidati per l'eradicazione della MRD nei sottogruppi molecolari specifici. Nei tumori RAS wild-type (~45%), la combinazione di anticorpi anti-EGFR con la chemioterapia ha dimostrato un migliore controllo della malattia rispetto alla sola chemioterapia. Nei tumori HER2-amplificati (3–7%), la doppia inibizione anti-HER2 ha prodotto tassi di risposta significativi. Nei tumori MSI-H/MMRd o POLE-mutati (4–6%), gli inibitori dei checkpoint immunitari hanno evidenziato un marcato beneficio in termini di sopravvivenza libera da progressione e sopravvivenza globale. Nei tumori RAS-mutati (35–40%), la temozolomide, soprattutto nei casi con metilazione di MGMT, ha mostrato attività clinica, anche in combinazione con irinotecan. Infine, nei tumori BRAF V600E-mutati (8–10%), la combinazione di inibitori di BRAF ed EGFR ha dimostrato un vantaggio significativo rispetto allo standard terapeutico.

Nel complesso, tali evidenze forniscono il razionale biologico per traslare nel setting adiuvante strategie già consolidate nella malattia metastatica, utilizzando la biopsia liquida come strumento per identificare la persistenza di malattia molecolare. L'integrazione tra genomica

tumorale e monitoraggio dinamico del ctDNA apre quindi la prospettiva di una personalizzazione terapeutica adattiva, finalizzata all'eradicazione precoce della MRD e al miglioramento degli esiti clinici nei pazienti con carcinoma del colon in stadio II ad alto rischio e III.

1.1.6.1 Limiti della terapia adiuvante con oxaliplatino: tossicità e overtreatment

L'oxaliplatino è un agente alchilante appartenente alla famiglia dei composti del platino di terza generazione, ampiamente utilizzato nei regimi chemioterapici per il carcinoma del colon-retto. In associazione con fluoropirimidine nei protocolli FOLFOX e CAPOX, rappresenta tuttora uno standard terapeutico ampiamente utilizzato. Tuttavia, nonostante i benefici dimostrati in termini di riduzione del rischio di recidiva, il suo impiego è associato ad un profilo di tossicità che ne limita l'utilizzo ottimale e solleva importanti interrogativi sul bilancio rischio-beneficio, soprattutto in un contesto adiuvante a intento curativo [44,45].

Tra gli eventi avversi, la neurotossicità periferica rappresenta la principale tossicità dose-limitante e si manifesta tipicamente in due forme cliniche:

- Forma acuta: caratterizzata da parestesie e disestesie scatenate o accentuate dall'esposizione al freddo, spesso a carico di estremità e della regione orofaringea, con insorgenza durante o nelle ore successive all'infusione. In molti casi è transitoria, ma può risultare particolarmente fastidiosa e influire sulla tollerabilità complessiva della terapia.
- Forma cronica: legata soprattutto alla dose cumulativa e può tradursi in una neuropatia sensitiva persistente, con sintomi quali formicolio, ipoestesia, alterazioni della sensibilità vibratoria e deficit funzionali che interferiscono con le attività quotidiane [46].

Un aspetto clinicamente rilevante della terapia con oxaliplatino è il cosiddetto *coasting phenomenon*, caratterizzato dal peggioramento o dalla comparsa tardiva della neuropatia periferica nelle settimane o nei mesi successivi alla sospensione del trattamento. Questo andamento ritardato rende la neurotossicità una complicanza che può persistere anche nel FU, con un impatto significativo sulla qualità di vita. Studi osservazionali e prospettici hanno documentato la presenza di sintomi neuropatici persistenti in una quota non trascurabile di

pazienti, soprattutto dopo esposizioni prolungate, configurando la neuropatia come una delle principali cause di riduzione di dose, ritardi o interruzione della chemioterapia [47].

Oltre alla neurotossicità, l'oxaliplatino può determinare tossicità ematologiche, quali neutropenia e trombocitopenia, e disturbi gastrointestinali come nausea, vomito e diarrea. Sebbene generalmente gestibili con adeguate misure di supporto, tali eventi possono compromettere la tollerabilità complessiva del trattamento, in particolare nei pazienti fragili o anziani [48].

Nel setting adiuvante del carcinoma del colon-retto, la gestione della neurotossicità ha assunto un ruolo centrale nella definizione della durata ottimale della terapia. Studi randomizzati che hanno confrontato tre mesi versus sei mesi di trattamento contenente oxaliplatino hanno dimostrato che una riduzione della durata è associata a una diminuzione significativa della tossicità, soprattutto neuropatica, mantenendo in specifici sottogruppi un'efficacia non sostanzialmente inferiore [49]. Queste evidenze hanno rafforzato l'interesse verso strategie di de-escalation terapeutica, con l'obiettivo di limitare l'overtreatment e le sequele a lungo termine nei pazienti con beneficio potenzialmente marginale.

In tale prospettiva si inserisce lo sviluppo di strumenti di monitoraggio molecolare, in particolare l'analisi del DNA tumorale circolante (ctDNA) per la rilevazione della malattia minima residua. La positività del ctDNA nel periodo post-operatorio si è dimostrata fortemente predittiva di recidiva, configurandosi come biomarcatore dinamico ad elevata sensibilità. L'integrazione tra stratificazione molecolare del rischio e monitoraggio dinamico consente quindi di identificare con maggiore precisione i pazienti che possono beneficiare della terapia adiuvante con oxaliplatino, evitando un'esposizione non necessaria a tossicità potenzialmente irreversibili nei soggetti a basso rischio biologico. Studi sperimentali come Sagittarius si collocano in questa direzione, con l'obiettivo di ottimizzare le decisioni terapeutiche negli stadi II ad alto rischio e III, riducendo il sovratrattamento e individuando precocemente i pazienti candidabili a un'eventuale intensificazione terapeutica.

1.2 Biopsia liquida

La medicina di precisione è un approccio innovativo che tiene conto della variabilità individuale, attraverso lo studio integrato della genetica, dell'epigenetica e dei dati clinici, nella pratica e gestione clinica dei singoli pazienti. A differenza della medicina tradizionale che adotta gli stessi protocolli su pazienti con la stessa diagnosi, la medicina di precisione sposta la sua attenzione sul singolo e mira a stratificare i pazienti in sottogruppi, individuando marcatori molecolari o fenotipici comuni e identificando tratti unici che aumentano e migliorano la possibilità di successo terapeutico [50].

Un ruolo importante nell'oncologia di precisione è stato assunto negli ultimi anni dalla biopsia liquida, una tecnica di recente introduzione che ha apportato un cambiamento radicale nel modo di diagnosticare, monitorare e trattare il cancro, in quanto dopo la resezione chirurgica di un tumore primitivo, la presenza di malattia minima residua non è sempre identificabile con le metodiche radiologiche convenzionali, pur rappresentando il principale determinante biologico della recidiva. In questo contesto, la biopsia liquida emerge come strumento capace di intercettare, in maniera dinamica e non invasiva, tracce molecolari della persistenza tumorale.

Anche se la biopsia tissutale rimane il gold standard nella pratica clinica, l'idea che sia possibile ricavare informazioni molecolari e funzionali di un tumore, senza dover necessariamente ricorrere a procedure invasive, rappresenta una vera e propria rivoluzione nella gestione del paziente. La biopsia tissutale, infatti, presenta non poche limitazioni, tra cui l'invasività, i rischi legati all'asportazione chirurgica, che non consentono di utilizzarla per un monitoraggio continuo e costante della malattia. Inoltre, il prelievo di tessuto, un frammento del tumore, offre solo una fotografia statica e localizzata della neoplasia, limitata da fattori come l'eterogeneità intratumorale e dalla difficoltà di ottenere campioni rappresentativi, soprattutto in pazienti con malattia metastatica o in sedi di difficile accesso.

La biopsia liquida, perciò si inserisce in questo scenario come uno strumento prezioso, innovativo, minimamente invasivo e ripetibile, capace di superare tali barriere e fornire una visione dinamica della biologia e l'evoluzione tumorale.

Ad oggi, il sangue rappresenta il fluido biologico più utilizzato per la biopsia liquida ed è considerato una fonte ricca di informazioni molecolari utili da un punto di vista diagnostico, prognostico e predittivo. Tuttavia, anche altri fluidi corporei hanno dimostrato un forte potenziale informativo, offrendo, in alcuni casi, un campione maggiormente rappresentativo rispetto al sangue, a seconda della sede tumorale [51].

L'urina, ad esempio, è particolarmente utile nello studio dei tumori urologici, sia perché a diretto contatto con il tumore stesso, sia perché offre la possibilità di campionamenti frequenti e per nulla invasivi. Inoltre, l'urina ha suscitato un interesse particolare anche nel contesto del carcinoma polmonare. Nel DNA isolato dalle urine (utDNA) di pazienti con NSCLC, sono state infatti rilevate mutazioni del gene EGFR, le quali sono associate allo sviluppo di resistenza agli inibitori tirosino-chinasici di prima generazione. Queste sono state rilevate nelle urine prima ancora che nel plasma e, anticipando quasi sempre la risposta clinico-radiologica nella quasi totalità della coorte studiata, l'analisi dell'urina ha dimostrato non solo l'utilità nel monitorare la risposta ai trattamenti, ma anche nell'orientare la scelta terapeutiche [52].

Il liquido cerebrospinale, invece, rappresenta il fluido corporeo di elezione per lo studio dei tumori del sistema nervoso centrale (SNC). Nei linfomi confinati al SNC, infatti, il DNA tumorale è stato isolato esclusivamente dal liquor, sottolineando l'elevato potenziale informativo di questo fluido.

Anche la saliva si è ormai affermata come promettente fonte di biomarcatori nei tumori della testa e del collo. La presenza di concentrazioni elevate di DNA e RNA derivati dal tumore in questo fluido offre la possibilità di un monitoraggio non invasivo e facilmente integrabile nella pratica clinica [53].

Emerge con chiarezza, quindi, che la scelta del fluido da analizzare dipende dal contesto clinico, dalla sede tumorale e dalla disponibilità del campione e che ciascuno di essi può offrire una prospettiva diversa sullo stato della malattia.

Il presupposto biologico alla base della biopsia liquida risiede nel fatto che i tumori solidi rilasciano costantemente nel circolo ematico materiale biologico derivante dalle cellule neoplastiche primarie e metastatiche. Tale rilascio avviene attraverso meccanismi di apoptosi, necrosi, secrezione attiva o disseminazione cellulare, generando una popolazione eterogenea di biomarcatori circolanti che riflettono, almeno in parte, la composizione genomica e l'eterogeneità clonale del tumore [54].

Tra i principali analiti identificabili mediante biopsia liquida si distinguono:

- ctDNA, frazione del DNA libero circolante (cell-free DNA, cfDNA) derivante specificamente dalle cellule tumorali;
- Cellule tumorali circolanti (CTC), cellule neoplastiche vitali che si distaccano dal tumore primario o da metastasi;

- RNA tumorale circolante, inclusi microRNA e RNA messaggeri tumorali;
- Vescicole extracellulari ed esosomi, contenenti DNA, RNA e proteine tumorali.

La *Figura 4* illustra come, da un semplice campione di fluido biologico, sia possibile isolare diversi biomarcatori circolanti, tra cui CTC, ctDNA, RNA e EV, rilasciati dal tumore primario e/o dalle metastasi. L'analisi di questi componenti consente di ottenere informazioni in tempo reale sul profilo molecolare del tumore, supportando la diagnosi, la stratificazione prognostica e il monitoraggio della risposta terapeutica in modo non invasivo [55].

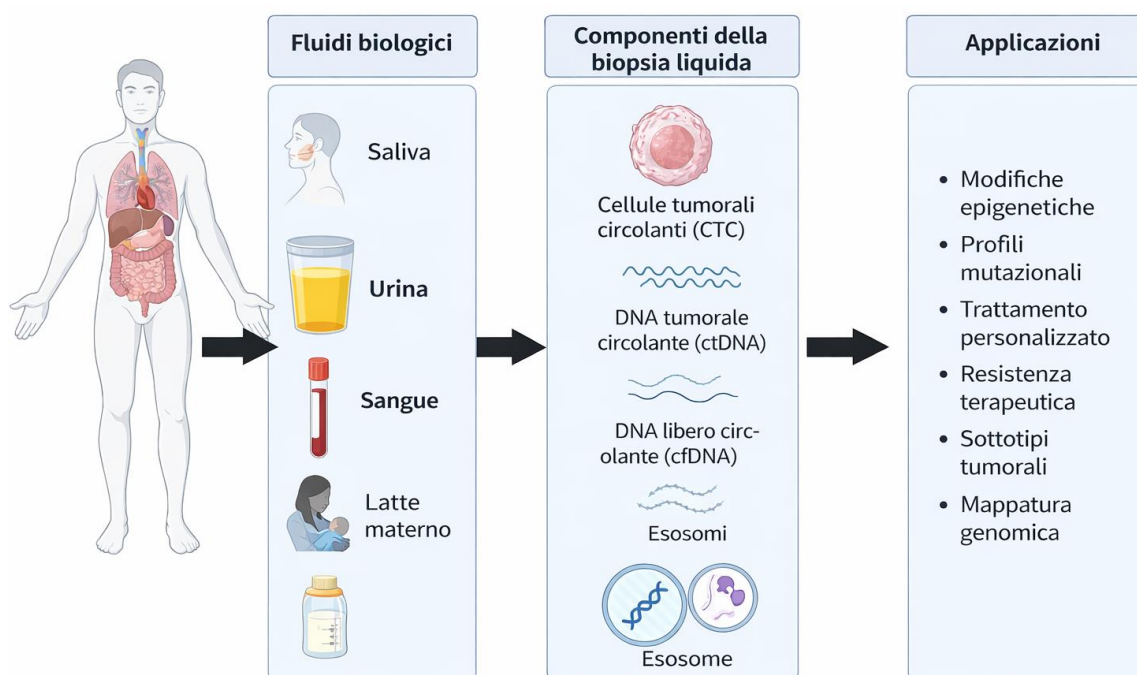


Figura 4. Rappresentazione schematica dei fluidi biologici utilizzabili per la biopsia liquida, delle principali componenti analizzabili (CTC, ctDNA, cfDNA, esosomi) e delle relative applicazioni cliniche in oncologia. Figura elaborata dall'autore.

È tuttavia fondamentale sottolineare che la biopsia liquida non sostituisce la biopsia tissutale ai fini diagnostici, poiché non fornisce informazioni morfologiche né consente una valutazione istologica completa. Il suo valore risiede piuttosto nell'integrazione con la diagnostica tradizionale, in un'ottica di medicina di precisione orientata alla caratterizzazione molecolare e al monitoraggio personalizzato del paziente oncologico [56].

1.2.1 DNA tumorale circolante: ctDNA

Il cfDNA consiste in frammenti di DNA a doppia elica di piccole dimensioni, tipicamente 130–180 paia di basi, che circolano nel sangue non associati a cellule. Nei pazienti oncologici, una frazione del cfDNA proviene dalle cellule tumorali ed è definita ctDNA (*Figura 5*).

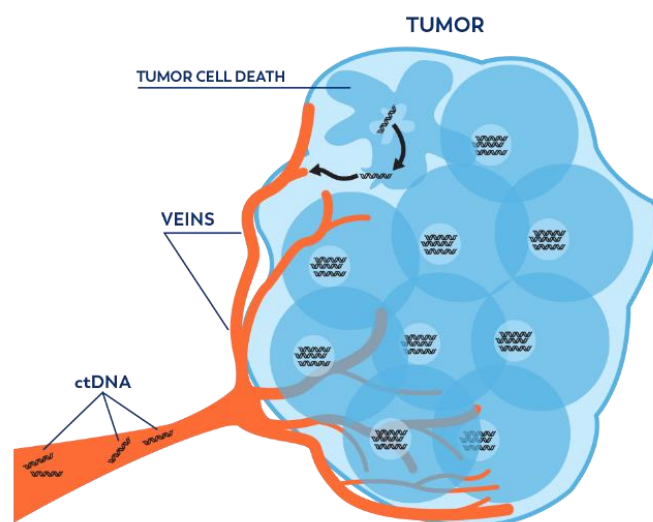


Figura 5. Rappresentazione schematica del rilascio di ctDNA nel torrente ematico a seguito di morte cellulare tumorale. (da LUNGeVity Foundation. Circulating tumor DNA (ctDNA), 2022)

Tali frammenti riflettono il profilo mutazionale del tumore primitivo e delle eventuali metastasi, inclusi i cloni emergenti selezionati dalla pressione terapeutica e sono rilasciati nel circolo ematico da cellule neoplastiche apoptotiche, necrotiche o attivamente secernenti materiale genomico.

Dal punto di vista biomolecolare, la rilevazione del ctDNA si basa sull'identificazione di varianti somatiche specifiche del tumore, precedentemente caratterizzate attraverso analisi genomica del tessuto neoplastico. Questo approccio tumor-informed consente di aumentare sensibilità e specificità del test, poiché la ricerca nel plasma è mirata a mutazioni note e individualizzate. L'assenza o la presenza di tali alterazioni nel sangue periferico dopo trattamento chirurgico rappresenta un indicatore diretto della persistenza di cloni tumorali residui a livello microscopico [57].

Numerosi studi hanno dimostrato che la positività del ctDNA nel periodo post-operatorio è associata a un rischio significativamente aumentato di recidiva rispetto ai pazienti ctDNA-negativi, anche in assenza di evidenza radiologica di malattia. In particolare, nei tumori in stadio II e III, la rilevazione di ctDNA dopo resezione rappresenta un potente fattore prognostico

indipendente, suggerendo che la malattia minima residua possa essere intercettata mesi prima della comparsa clinica o strumentale della recidiva [58].

Dal punto di vista quantitativo, la frazione tumorale del cfDNA può essere estremamente variabile e dipende da molteplici fattori, tra cui il volume tumorale, la sede della neoplasia, la vascolarizzazione, il tasso di turnover cellulare e la presenza di malattia metastatica. Nei tumori in fase iniziale o in condizioni di malattia minima residua, la concentrazione di ctDNA può essere estremamente bassa, richiedendo metodiche analitiche ad elevata sensibilità.

Un elemento distintivo del ctDNA rispetto ad altre componenti della biopsia liquida è la sua elevata specificità molecolare. Attraverso le tecniche più innovative come la Next Generation Sequencing (NGS), oltre a quantificare, è stato possibile caratterizzare il ctDNA aprendo così la strada all'utilizzo, sempre più diffuso, del ctDNA nell'ambito clinico [59].

Nel carcinoma del colon-retto metastatico (mCRC) le mutazioni dei geni RAS e RAF sono predittrici di resistenza ai trattamenti anti-EGFR e l'utilizzo del ctDNA in ambito clinico ha portato non solo a identificare e monitorare lo stato mutazionale di questi geni e permettere di selezionare i pazienti candidabili alla terapia anti-EGFR in maniera più accurata, ma anche di farlo in maniera non invasiva e piuttosto rapida [60].

Oltre al valore prognostico, il monitoraggio longitudinale del ctDNA consente di valutare la risposta biologica alla terapia adiuvante e di identificare precocemente l'emergenza di resistenze molecolari offrendo la possibilità di un tempestivo adattamento terapeutico [61]. In questa prospettiva, la biopsia liquida non si configura soltanto come strumento diagnostico complementare, ma come vero biomarcatore dinamico di evoluzione tumorale, capace di integrare informazione genomica, cinetica di malattia e decisione terapeutica.

Nel carcinoma colon-rettale in stadio II ad alto rischio e stadio III, dove la scelta della terapia adiuvante comporta un delicato bilanciamento tra beneficio clinico e tossicità, l'identificazione della malattia minima residua (MRD) tramite ctDNA offre la possibilità di modulare l'intensità del trattamento sulla base del rischio biologico individuale. Le evidenze, ormai, suggeriscono che la MRD è strettamente associata alla recidiva di malattia e che l'identificazione di specifiche alterazioni genetiche e molecolari su ctDNA suggestive di MRD, permetterebbe di stratificare i pazienti e di identificare quelli a maggior rischio di recidiva supportando il processo decisionale clinico e migliorando gli esiti clinici nei tumori maligni [62]. Questo approccio si inserisce pienamente nel paradigma della medicina di precisione, riducendo il

rischio di overtreatment nei pazienti realmente guariti dalla chirurgia e, al contempo, consentendo una strategia più intensiva nei soggetti a elevato rischio molecolare di recidiva.

Pur avendo un grande potenziale, l'utilizzo del ctDNA in ambito clinico comporta ancora diverse sfide. In primo luogo, la quantità di DNA rilasciata in circolo è spesso molto bassa, rendendo necessario l'impiego di tecnologie ad altissima sensibilità e, di conseguenza, ad elevato costo, come il Cancer Personalized Profiling by Deep Sequencing (CAPP-Seq) o sistemi che combinano la digital PCR con la citometria a flusso (BEAMing) [63].

Un secondo limite riguarda l'interpretazione dei risultati negativi. Nel caso in cui l'analisi del DNA tumorale circolante identifichi una mutazione o un'alterazione genetica caratteristica di una determinata neoplasia, il dato assume elevata affidabilità e rilevanza clinica. Al contrario, l'assenza di alterazioni rilevabili non esclude necessariamente la presenza di malattia, poiché la quantità di DNA tumorale circolante può essere al di sotto del limite di rilevazione della metodica impiegata o non essere adeguatamente rappresentativa del tumore. Pertanto, in presenza di sospetto clinico, un risultato negativo dovrebbe essere interpretato con cautela.

Nel loro insieme, queste evidenze supportano il ruolo della biopsia liquida come naturale evoluzione dell'utilizzo dei biomarcatori molecolari, consentendo un monitoraggio longitudinale della malattia e aprendo nuove prospettive per strategie terapeutiche adattive e personalizzate. L'integrazione della biopsia liquida nei percorsi di ricerca clinica rappresenta pertanto un passaggio cruciale verso l'applicazione concreta della medicina di precisione, ponendo le basi biologiche e metodologiche per studi clinici biomarker-driven, come Sagittarius che verrà approfondito nei capitoli successivi.

1.2.2 MRD: malattia residua minima

Nel carcinoma del colon-retto, la malattia residua minima rappresenta la persistenza di cellule tumorali vitali o di materiale genetico neoplastico dopo resezione chirurgica radicale, in quantità non rilevabili mediante metodiche radiologiche convenzionali, ma biologicamente attive e potenzialmente responsabili di recidiva clinica. Questo concetto ha progressivamente assunto un ruolo centrale nell'oncologia moderna, poiché consente di interpretare la progressione tumorale non soltanto come fenomeno anatomico, ma come processo dinamico e molecolare [64,65].

Non tutte le cellule disseminate sono tuttavia in grado di generare metastasi clinicamente manifeste. Solo una frazione di esse possiede proprietà biologiche sufficienti alla sopravvivenza e alla successiva espansione proliferativa in un microambiente secondario. Questo introduce il concetto di dormienza tumorale, condizione in cui cellule neoplastiche disseminate rimangono in uno stato quiescente o a bassa attività proliferativa per periodi prolungati, sfuggendo sia al sistema immunitario sia agli effetti citotossici della chemioterapia adiuvante [66]. La riattivazione di tali cloni può avvenire in seguito a modificazioni del microambiente, alterazioni immunitarie o ulteriori eventi molecolari, determinando la comparsa clinica della recidiva.

Dal punto di vista genomico, la MRD rappresenta spesso una popolazione clonale selezionata. I cloni residui possono presentare caratteristiche biologiche distintive rispetto al tumore primitivo. Questo fenomeno di selezione clonale contribuisce alla spiegazione della resistenza terapeutica e della recidiva tardiva [67].

La rilevazione della MRD mediante analisi del ctDNA rappresenta un cambiamento paradigmatico, in quanto la breve emivita plasmatica, di circa 1–2 ore, riflette un rilascio continuo da cellule tumorali vitali e suggerisce la persistenza di malattia residua biologicamente attiva. [68,69].

Numerosi studi prospettici hanno consolidato il valore prognostico della malattia molecolare residua (MRD) valutata mediante ctDNA nel carcinoma coloretale (CRC) localizzato.

Lo studio di Reinert et al. ha dimostrato che la positività del ctDNA nel periodo post-operatorio identifica in modo altamente sensibile i pazienti destinati a sviluppare recidiva, con una anticipazione di diversi mesi rispetto alla diagnosi radiologica, confermando il ctDNA come biomarcatore dinamico di recidiva precoce [70]. Parallelamente, Tie et al., in una coorte di pazienti con carcinoma del colon in stadio II sottoposti a resezione chirurgica, hanno evidenziato che la presenza di ctDNA nel plasma dopo l'intervento si associa a un rischio di recidiva significativamente più elevato rispetto ai pazienti ctDNA-negativi, mentre la negatività del biomarcatore correla con prognosi favorevole, suggerendo l'assenza di MRD rilevabile [71].

Successivamente, Tie et al. hanno esteso tali osservazioni allo stadio III, dimostrando che la positività del ctDNA sia dopo chirurgia sia al termine della chemioterapia adiuvante si associa a una marcata riduzione della sopravvivenza libera da malattia (DFS). In questo studio, la clearance del ctDNA durante il trattamento risultava correlata a prognosi migliore, mentre la

sua persistenza identificava pazienti con malattia biologicamente resistente alla terapia sistemica [72].

Ulteriori conferme provengono dall'analisi di Henriksen et al., che nei pazienti con CRC in stadio III hanno documentato come il monitoraggio seriale del ctDNA consenta una stratificazione prognostica più accurata rispetto ai parametri clinico-patologici tradizionali, con una netta separazione delle curve di sopravvivenza tra soggetti ctDNA-positivi e negativi [73].

Un contributo determinante è stato fornito dal trial GALAXY, parte del programma CIRCULATE-Japan, pubblicato da Kotani et al.. In questa ampia coorte prospettica di pazienti con carcinoma coloretale in stadio I–III sottoposti a resezione radicale, la positività del ctDNA nel periodo post-operatorio è risultata associata a un rischio di recidiva significativamente aumentato rispetto ai pazienti ctDNA-negativi (hazard ratio >10), con una separazione precoce e marcata delle curve di DFS. Inoltre, lo studio ha suggerito un ruolo predittivo del ctDNA nel selezionare i pazienti che traggono beneficio dalla chemioterapia adiuvante, aprendo la strada a strategie terapeutiche guidate dalla MRD [74].

Nel complesso, queste evidenze dimostrano in modo coerente che la rilevazione del ctDNA post-chirurgico rappresenta un potente biomarcatore prognostico indipendente, capace di anticipare la recidiva clinica e di orientare le decisioni terapeutiche in un'ottica di medicina di precisione.

È proprio in questa transizione concettuale, dalla stadiazione anatomica alla stratificazione molecolare dinamica, che si inserisce lo studio Sagittarius. Attraverso il monitoraggio del ctDNA come indicatore diretto di MRD, Sagittarius mira a integrare biologia tumorale e pratica clinica, ottimizzando la selezione dei pazienti in stadio II ad alto rischio e III per la terapia adiuvante e riducendo l'overtreatment nei soggetti biologicamente a basso rischio.

1.3 Sagittarius

Nonostante la resezione chirurgica radicale rappresenti il trattamento curativo di prima linea nel carcinoma del colon in stadio II ad alto rischio e III, una quota clinicamente rilevante di pazienti sviluppa recidiva di malattia nei mesi o anni successivi all'intervento. Tale fenomeno suggerisce la presenza di MRD non rilevabile mediante metodiche radiologiche convenzionali, ma biologicamente attiva e responsabile della progressione futura.

L'attuale decisione in merito alla terapia adiuvante si basa prevalentemente su parametri anatomopatologici come stadiazione TNM, grading, invasione vascolare o perineurale, numero di linfonodi esaminati e su fattori clinici tradizionali. Sebbene tali criteri rappresentino strumenti prognostici consolidati, essi non sempre riflettono l'effettivo rischio biologico individuale. Ne deriva il rischio di sovratrattamento in pazienti biologicamente guariti dalla chirurgia, esposti inutilmente alla tossicità della chemioterapia contenente oxaliplatino, e, al contrario, di sottotrattamento in soggetti con malattia molecolare residua non intercettata dai criteri convenzionali.

In questo contesto si inserisce il ruolo emergente del ctDNA quale biomarcatore dinamico di MRD. Numerose evidenze scientifiche hanno dimostrato che la positività del ctDNA nel periodo post-operatorio si associa a un rischio significativamente aumentato di recidiva, configurandosi come potente fattore prognostico indipendente. Parallelamente, la negatività del ctDNA suggerisce un rischio biologico più basso, aprendo la possibilità di strategie di de-escalation terapeutica.

Lo studio Sagittarius nasce con l'obiettivo di integrare la valutazione molecolare tumor-informed con un modello decisionale terapeutico adattivo, superando l'approccio statico basato esclusivamente sulla stadiazione anatomica. Esso rappresenta un esempio paradigmatico di trial biomarker-driven nell'ambito della medicina oncologica di precisione.

Sagittarius è, uno studio clinico prospettico, randomizzato, multicentrico internazionale di fase III, attualmente in corso in 12 ospedali in Italia, 13 in Spagna e 1 in Germania, promosso da IFOM.

Si propone come obiettivo primario quello di dimostrare che una strategia terapeutica personalizzata, basata sulla profilazione genomica del tumore e guidata dall'analisi del ctDNA, sia in grado di migliorare gli esiti clinici nei pazienti affetti da carcinoma del colon in stadio III e in stadio II ad alto rischio rispetto all'approccio adiuvante chemioterapico convenzionale.

Soprattutto, l'obiettivo è migliorare l'esito clinico nei pazienti con ctDNA positivo, randomizzati a ricevere un trattamento mirato guidato da dati genomici, braccio sperimentale, rispetto alla chemioterapia adiuvante convenzionale, braccio di controllo.

Tra gli obiettivi secondari rientra il confronto della sopravvivenza libera da recidiva (RFS) a due anni tra la chemioterapia adiuvante scelta dal medico e il trattamento ridimensionato nei pazienti ctDNA-negativi, nonché la valutazione comparativa della tossicità e della qualità di vita associate alle strategie personalizzate rispetto a quelle standard. Ulteriori obiettivi includono l'analisi dell'impatto economico della terapia sul paziente e la determinazione del tasso di falsi negativi delle biopsie liquide seriali nei bracci sperimentali, al fine di valutare l'affidabilità del monitoraggio molecolare nel tempo.

Tra gli obiettivi esplorativi, lo studio intende valutare il potenziale del ctDNA come endpoint surrogato al termine del trattamento nel carcinoma colon e identificare sottogruppi biologicamente distinti di pazienti, distinguendo coloro che presentano evidenza molecolare di malattia residua, detti "*born-to-be-bad*", potenzialmente caratterizzati da un fenotipo più aggressivo, da quelli ctDNA-negativi detti "*born-to-be-good*", considerati a basso rischio biologico, nell'ottica di sviluppare ulteriori linee di ricerca integrativa.

Sagittarius presenta un disegno basato su:

- rilevazione tumor-informed della MRD;
- stratificazione molecolare genomica;
- randomizzazione nei sottogruppi biologicamente definiti;
- adattamento terapeutico dinamico sulla base della clearance o persistenza del ctDNA.

Se confermato, tale modello potrebbe ridefinire l'approccio terapeutico nel carcinoma del colon operabile, superando il paradigma uniforme della chemioterapia adiuvante e introducendo una gestione realmente personalizzata, orientata alla biologia del singolo tumore e finalizzata a massimizzare l'efficacia clinica riducendo la tossicità non necessaria.

1.3.1 Disegno dello studio

In *Figura 6* è riportato il disegno dello studio. In una fase preliminare, il tessuto tumorale di ciascun paziente viene sottoposto a profilazione genomica al fine di identificare la specifica “firma molecolare” del tumore. Tale caratterizzazione consente di sviluppare un test di biopsia liquida personalizzato, basato sulle varianti somatiche individuali, finalizzato alla rilevazione della malattia micrometastatica residua nel periodo post-operatorio.

Qualora l’analisi del DNA tumorale circolante evidenzia la presenza di malattia minima residua, i pazienti vengono randomizzati a ricevere la chemioterapia adiuvante standard oppure una strategia terapeutica personalizzata, che può includere trattamenti a bersaglio molecolare o immunoterapia, selezionati in base al profilo genomico del tumore.

Nel caso in cui il test non rilevi evidenza molecolare di micrometastasi, i pazienti, potenzialmente già guariti mediante l’intervento chirurgico, vengono assegnati casualmente a una strategia terapeutica meno intensiva, che può consistere in un trattamento adiuvante modulato secondo la valutazione clinica del medico, oppure in un approccio di sorveglianza attiva, “*wait and see*”, basato su un monitoraggio clinico e molecolare per un periodo di due anni senza ulteriori terapie sistemiche.

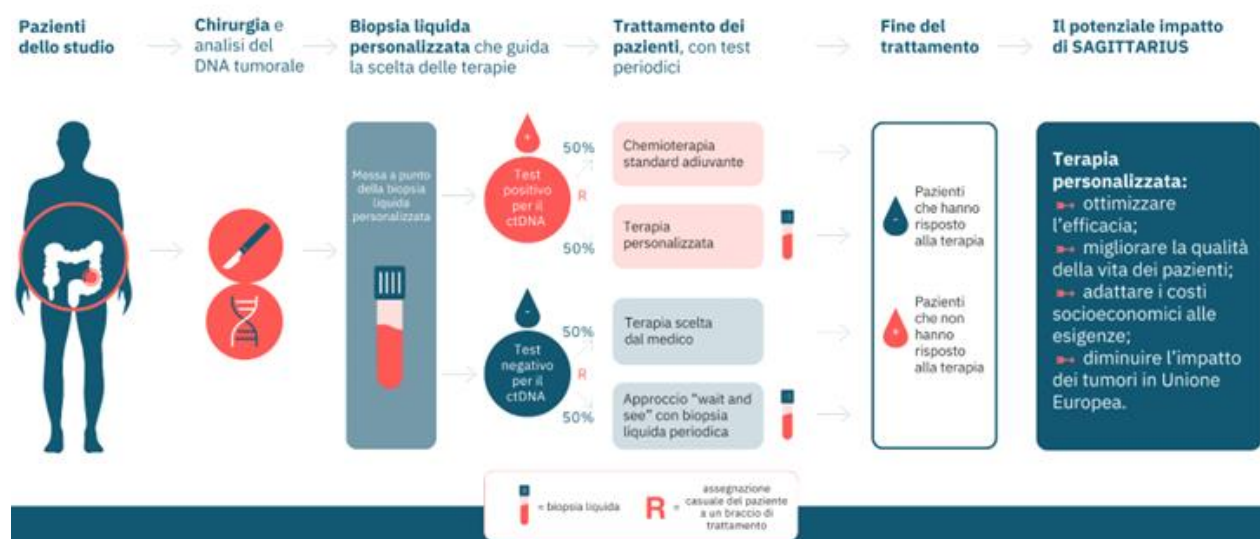


Figura 6. Progetto Sagittarius. IFOM, 2024

Nel primo percorso, riservato ai pazienti con ctDNA positivo dopo resezione chirurgica, l’obiettivo primario è l’eradicazione della malattia minima residua. Questi pazienti sono

considerati ad alto rischio di recidiva e sono candidati a un trattamento adiuvante intensificato. In funzione del profilo genomico tumorale (ad esempio mutazioni di RAS/RAF, alterazioni di HER2, stato di instabilità dei microsatelliti) e delle caratteristiche molecolari individuali, la terapia viene adattata attraverso l'impiego di regimi standard (come chemioterapia combinata con oxaliplatino o irinotecan) integrati o sostituiti da terapie target e/o immunoterapie specifiche. La strategia terapeutica è dinamica: la clearance o la persistenza del ctDNA nel tempo può guidare modifiche terapeutiche successive, con l'obiettivo di massimizzare l'efficacia clinica mantenendo un profilo di sicurezza accettabile.

Nel secondo percorso, indirizzato ai pazienti con ctDNA negativo dopo chirurgia, l'approccio è orientato alla riduzione dell'esposizione a trattamenti potenzialmente tossici senza comprometterne l'efficacia. In questi soggetti, l'assenza di MRD molecolare suggerisce un rischio biologico di recidiva relativamente basso, aprendo la possibilità a una strategia di sorveglianza intensiva o a una de-escalation terapeutica rispetto agli schemi adiuvanti convenzionali. Il fine è minimizzare la tossicità cumulativa, migliorare la qualità di vita e ridurre l'onere terapeutico e sanitario, pur mantenendo un attento monitoraggio clinico e molecolare.

Questi due percorsi rappresentano due estremi di una strategia di medicina di precisione: da un lato, rispondere aggressivamente al rischio molecolare elevato per prevenire recidive potenzialmente fatali; dall'altro, evitare sovra-trattamenti in pazienti con basso rischio biologico. La distinzione tra i percorsi è resa possibile dalla valutazione del ctDNA come biomcatore dinamico e dalla profilazione genomica tumor-informed, che consente di personalizzare la terapia in funzione delle caratteristiche molecolari e dell'evoluzione biologica della malattia residua.

1.3.1.1 Popolazione

Lo studio prevede l'arruolamento di circa 700-900 pazienti con diagnosi istologicamente confermata di carcinoma del colon operabile in stadio III o in stadio II ad alto rischio. La neoplasia dovrà essere localizzata ad almeno 12 cm dal margine anale, come documentato mediante valutazione endoscopica, e situata al di sopra della riflessione peritoneale. Tutti i pazienti dovranno aver effettuato un intervento chirurgico con intento curativo, ottenendo una resezione in assenza di evidenza di malattia residua.

Nel presente studio verranno definite le seguenti popolazioni di analisi:

- **Popolazione “Tutti i soggetti” (All Subjects, AS):** comprenderà tutti i pazienti che hanno firmato il consenso informato e sono stati randomizzati sulla base dello stato del ctDNA post-operatorio nel Trial-1 o nel Trial-2. Questa popolazione sarà utilizzata per la descrizione della disposizione dei soggetti e per l’elenco completo delle variabili, riportando il numero totale di pazienti randomizzati, i ritiri e le relative motivazioni, sia complessivamente sia suddivisi nei diversi bracci di trattamento.
- **Popolazione Intent-to-Treat (ITT):** includerà tutti i pazienti randomizzati in base allo stato del ctDNA post-operatorio, purché non presentino deviazioni rilevanti dai criteri di eleggibilità tali da determinarne l’esclusione dai set di analisi.
- **Popolazione Per Protocol (PP):** sarà costituita dai pazienti appartenenti alla popolazione ITT che non abbiano presentato deviazioni significative dal protocollo tali da influenzare l’endpoint primario. In particolare, includerà i pazienti che abbiano ricevuto almeno 3 mesi di chemioterapia standard nel braccio convenzionale sia nel Trial-1 che nel Trial-2, e almeno il 75% del trattamento personalizzato previsto nel braccio sperimentale del Trial-1.
- **Popolazione di sicurezza (SAF):** comprenderà tutti i pazienti che hanno firmato il consenso informato, sono stati randomizzati in uno dei due trial sulla base dello stato del ctDNA post-operatorio, non presentano violazioni significative dei criteri di eleggibilità e hanno ricevuto almeno una dose di trattamento, indipendentemente dalla durata effettiva della terapia. I soggetti verranno analizzati ai fini della sicurezza in base al trattamento effettivamente ricevuto.

La popolazione arruolata nello studio è tenuta a rispettare specifiche accortezze comportamentali e restrizioni previste dal protocollo, finalizzate a garantire la sicurezza dei partecipanti e la conformità alle normative regolatorie vigenti.

Per quanto concerne le abitudini alimentari, ai partecipanti è richiesto di mantenere una dieta abituale nel corso dello studio, salvo eventuali modifiche necessarie per la gestione di eventi avversi correlati al trattamento, quali diarrea, nausea o vomito, che possono richiedere temporanee variazioni dietetiche di supporto.

Un aspetto di particolare rilievo riguarda la contraccezione. In accordo con la linea guida ICH M3, che impone l’adozione di misure volte a minimizzare il rischio embrio-fetale negli studi

clinici che includono donne in età fertile, tutti i partecipanti con potenziale riproduttivo devono adottare metodi contraccettivi altamente efficaci prima dell'inizio del trattamento e per tutta la durata dello stesso.

In caso di gravidanza accidentale durante il trattamento, la partecipante sarà immediatamente sospesa dallo studio e seguita dal centro clinico con monitoraggio almeno mensile fino al completamento o all'interruzione della gravidanza. L'esito della gravidanza sarà notificato alla farmacovigilanza delegata qualora configuri un evento avverso grave, come morte fetale o neonatale, aborto spontaneo, malformazione congenita o altra complicanza grave per la madre o il neonato. Infine, le donne che allattano al momento dello screening non sono eleggibili all'arruolamento, in considerazione della possibile escrezione dei farmaci nel latte materno e del rischio potenziale di reazioni avverse gravi nel neonato.

1.3.1.2 Tossicità farmacologiche e gestione delle modifiche di dose nel protocollo

L'impiego della chemioterapia adiuvante e delle terapie target nel carcinoma del colon operabile è gravato da un profilo di tossicità clinicamente rilevante, che assume particolare importanza nel setting curativo, dove una quota significativa di pazienti potrebbe essere già guarita mediante la sola chirurgia. In questo contesto, l'esposizione a tossicità acute e cumulative deve essere attentamente bilanciata rispetto al beneficio atteso in termini di riduzione del rischio di recidiva. Il protocollo dello studio dedica un'ampia sezione alla gestione delle tossicità e alle modifiche di dose dei farmaci impiegati nei diversi bracci di trattamento, definendo criteri dettagliati di sospensione temporanea, riduzione o interruzione definitiva sulla base della classificazione CTCAE v5.0 (*Capitolo 3, Paragrafo 3.7*). I regimi a base di oxaliplatino (CAPOX e FOLFOX), standard nel trattamento adiuvante convenzionale, sono principalmente associati a neuropatia sensoriale periferica cumulativa, mielosoppressione e tossicità gastrointestinale; la neuropatia rappresenta la tossicità dose-limitante più rilevante e il protocollo prevede riduzioni progressive della dose o sospensione definitiva in presenza di neuropatia di grado ≥ 2 persistente o di grado ≥ 3 , al fine di prevenire danni neurologici irreversibili. Le fluoropirimidine (capecitabina e 5-fluorouracile) sono correlate a sindrome mano-piede, mucositi, diarrea e tossicità ematologica, per le quali sono stabiliti schemi di interruzione temporanea e successiva ripresa a dose ridotta in caso di eventi ricorrenti o di grado ≥ 2 clinicamente significativo. Nei sottogruppi molecolarmente selezionati che ricevono regimi contenenti irinotecan (FOLFIRI o TEMIRI), le principali tossicità includono diarrea precoce e

tardiva, neutropenia severa e astenia, con indicazione a riduzione della dose o sospensione in caso di tossicità ematologica o gastrointestinale di grado elevato. Le terapie a bersaglio molecolare e l'immunoterapia presentano profili di tossicità peculiari: gli anticorpi anti-EGFR sono associati prevalentemente a tossicità cutanee e alterazioni elettrolitiche; la combinazione anti-HER2 richiede monitoraggio della funzione cardiaca per il rischio di cardiotossicità; la doppia immunoterapia con inibitori di PD-1 e CTLA-4 espone a eventi avversi immuno-correlati multisistemici (colite, epatite, endocrinopatie, polmonite), per i quali il protocollo stabilisce criteri stringenti di sospensione e l'impiego tempestivo di terapia immunosoppressiva nei casi di grado ≥ 2 . La regolamentazione rigorosa delle modifiche di dose non costituisce esclusivamente un presidio di sicurezza, ma rappresenta un elemento strutturale coerente con il razionale dello studio: nei pazienti ctDNA negativi, la possibilità di de-escalation o sorveglianza intensiva mira a ridurre l'esposizione non necessaria a tossicità cumulative, mentre nei pazienti ctDNA positivi l'intensificazione terapeutica è biologicamente giustificata ma vincolata a criteri di tollerabilità stringenti. In tal modo, Sagittarius integra la personalizzazione biologica con una gestione dinamica della sicurezza farmacologica, perseguendo non solo l'ottimizzazione dell'outcome oncologico ma anche la minimizzazione del danno iatrogeno in un contesto a intento curativo.

1.3.1.3 Timeline ed Endpoint

Alla luce delle tempistiche previste dal protocollo, con un periodo di arruolamento stimato in 24 mesi e una durata complessiva di circa 48 mesi, la definizione degli endpoint è coerente con la necessità di garantire un FU adeguato alla maturazione degli eventi clinicamente rilevanti.

L'endpoint primario è rappresentato dalla Recurrence-Free Survival (RFS) a 2 anni nei pazienti che risultano ctDNA-positivi dopo la chirurgia e che vengono randomizzati con rapporto 1:1 a ricevere chemioterapia adiuvante convenzionale oppure una strategia terapeutica personalizzata basata sul profilo genomico tumorale. Tale misura consente di valutare in modo diretto l'efficacia dell'approccio personalizzato nel sottogruppo biologicamente ad alto rischio di recidiva, identificato mediante la presenza di malattia molecolare residua.

Tra gli endpoint secondari rientra la RFS, definita come il tempo dalla randomizzazione alla prima recidiva locale, regionale o a distanza, o morte per qualsiasi causa, nei pazienti ctDNA-negativi, anch'essi randomizzati 1:1 tra trattamento adiuvante scelto dal medico curante e strategia di FU intensivo, al fine di verificare la sicurezza clinica di un approccio di de-

escalation nei soggetti a basso rischio molecolare. Sono, inoltre, valutate la RFS e la Overall Survival (OS) a 3 e 5 anni nei pazienti di entrambi i trial, indipendentemente dall'assegnazione al braccio convenzionale o sperimentale, così da stimare l'impatto a lungo termine delle strategie terapeutiche adottate. Ulteriori endpoint secondari comprendono la sicurezza e tollerabilità dei trattamenti, analizzate secondo i criteri CTCAE versione 5.0, l'identificazione dei casi di falso negativo dopo tre biopsie liquide consecutive negative, definiti come pazienti che sviluppano recidiva radiologica entro due anni, e la valutazione della sierconversione del ctDNA, intesa come passaggio da positività a negatività dopo trattamento, con successivo mantenimento dello stato libero da malattia a 2 e 3 anni. È inoltre prevista l'analisi longitudinale della qualità di vita mediante i questionari validati FACT-C ed EQ-5D-5L, somministrati all'intera popolazione in studio.

Gli endpoint esplorativi mirano, infine, a correlare nuovi biomarcatori molecolari con gli endpoint tempo-dipendenti principali, quali RFS e OS, con l'obiettivo di approfondire il valore prognostico e potenzialmente predittivo delle caratteristiche biologiche emergenti nel carcinoma del colon operato.

Il significato clinico complessivo degli endpoint di Sagittarius risiede dunque nella possibilità di trasformare un biomarcatore prognostico in uno strumento decisionale operativo. Se lo studio dimostrerà che una strategia guidata dal ctDNA è in grado di mantenere o migliorare la DFS rispetto allo standard basato esclusivamente su criteri clinico-patologici, riducendo al contempo tossicità e sovratrattamento nei pazienti ctDNA-negativi, si realizzerà un passaggio cruciale: dalla semplice stratificazione anatomica della malattia, alla personalizzazione biologica della terapia adiuvante. In questo modo, la misurazione della MRD molecolare non sarà più soltanto un indicatore di rischio, ma diventerà il fondamento per una decisione terapeutica realmente calibrata sulla biologia individuale del tumore, consolidando il ruolo della medicina di precisione nel carcinoma del colon in stadio II ad alto rischio e III.

1.4 Ricerca clinica

Il termine *ricerca clinica* si riferisce all'insieme delle sperimentazioni condotte sull'uomo che coinvolgono direttamente i pazienti, con l'obiettivo di sviluppare nuovi farmaci o trattamenti, verificare nuove modalità di impiego terapeutico di farmaci già esistenti, migliorare le conoscenze sulle patologie e introdurre nuovi strumenti diagnostici. Più in generale, la ricerca clinica mira a perfezionare le strategie di prevenzione, diagnosi e cura delle malattie. Tali obiettivi vengono perseguiti attraverso la conduzione di studi clinici strutturati secondo protocolli rigorosi, finalizzati a valutarne la sicurezza e l'efficacia, nel rispetto delle normative vigenti e degli standard internazionali di qualità ed etica della ricerca clinica, definiti dalle Good Clinical Practice.

1.4.1 Metodologia e sviluppo dei trial clinici sperimentali

La ricerca clinica si articola in diverse tipologie di studi, ognuna con caratteristiche specifiche in termini di obiettivi, disegno metodologico e livello di evidenza scientifica prodotto. Tra questi, gli studi sperimentali occupano una posizione centrale, poiché prevedono un intervento da parte del ricercatore, generalmente rappresentato dall'introduzione di un trattamento farmacologico o di una procedura diagnostica, con l'obiettivo di valutarne l'attività terapeutica. Il modello metodologico di riferimento è il trial clinico controllato e randomizzato (Randomized Controlled Trial, RCT), considerato il gold standard nella valutazione dell'efficacia e sicurezza di nuovi farmaci o interventi terapeutici [75].

Nei trial randomizzati, i partecipanti vengono assegnati in modo casuale a uno dei gruppi di trattamento, generalmente distinti in gruppo sperimentale e gruppo di controllo. La randomizzazione rappresenta un passaggio metodologico cruciale, in quanto consente una distribuzione equilibrata delle caratteristiche note e ignote dei pazienti tra i gruppi, riducendo il rischio di bias di selezione e l'influenza di fattori confondenti [76]. L'assegnazione avviene solo dopo la verifica dei criteri di eleggibilità e l'arruolamento formale e garantisce imparzialità nel processo di distribuzione.

I gruppi di trattamento, spesso definiti come bracci dello studio, vengono seguiti nel tempo mediante la valutazione di esiti clinici prestabiliti e definiti a priori nel protocollo sperimentale. In questo modo, eventuali differenze statisticamente significative osservate tra i gruppi possono essere attribuite, in linea teorica, all'effetto del trattamento oggetto di studio. Molti studi clinici

randomizzati adottano procedure di mascheramento, in cui i partecipanti, gli sperimentatori e/o gli operatori incaricati delle valutazioni non sono a conoscenza del trattamento somministrato, a seconda che si parli di singolo, doppio o triplo, al fine di aumentare ulteriormente l'oggettività dei risultati. In conclusione, la randomizzazione costituisce una metodologia essenziale per la conduzione di studi clinici di elevata qualità, garantendo la validità e la comparabilità dei dati raccolti, elementi imprescindibili per il progresso della ricerca clinica e per la valutazione dei trattamenti farmacologici.

Il percorso di uno studio clinico è rigorosamente regolamentato per garantire risultati credibili e il rispetto dei diritti dei partecipanti. In questo iter strutturato e progressivo, ogni fase è definita da obiettivi specifici, criteri metodologici rigorosi e controlli etici stringenti che assicurano la tutela dei soggetti coinvolti e l'affidabilità dei dati raccolti.

La fase I rappresenta il primo utilizzo del farmaco nell'essere umano ed è un passaggio cruciale nello sviluppo clinico. Coinvolge un numero limitato di soggetti, volontari sani, ma in ambiti come l'oncologia o le malattie rare include direttamente pazienti. L'obiettivo principale è definire il profilo di sicurezza e tollerabilità, identificando la dose massima tollerata. Vengono inoltre studiati i parametri di farmacocinetica e farmacodinamica per comprenderne assorbimento, distribuzione, metabolismo, eliminazione ed effetti biologici. L'efficacia, se considerata, ha solo valore preliminare. Si tratta quindi di studi prevalentemente conoscitivi, condotti su pochi partecipanti, in centri specializzati e generalmente con disegno in aperto.

La fase II rappresenta una fase di esplorazione terapeutica volta a valutare preliminarmente l'efficacia del farmaco in una popolazione più ampia di pazienti affetti dalla patologia di interesse, confermandone al contempo la tollerabilità. Il trattamento è somministrato esclusivamente a soggetti malati, permettendo di analizzarne l'attività in un contesto clinico reale. Un obiettivo centrale è individuare la dose e lo schema terapeutico ottimali, come miglior equilibrio tra efficacia e sicurezza, approfondendo anche i parametri di farmacocinetica e gli effetti della somministrazione prolungata. Gli studi possono essere randomizzati e controllati, pur non sempre dotati di potenza statistica sufficiente per conclusioni definitive. Coinvolgono generalmente da alcune decine a poche centinaia di pazienti e possono prevedere disegni in aperto o in cieco, con confronti a dosi multiple per definire il regime da adottare nelle fasi successive.

La fase III rappresenta una tappa cruciale nello sviluppo di un trattamento, poiché mira alla conferma definitiva dell'efficacia e alla valutazione approfondita della sicurezza. Coinvolge

popolazioni ampie e rappresentative della pratica clinica reale, spesso in studi multicentrici e multinazionali della durata di diversi anni, per garantire risultati solidi e statisticamente robusti. L'obiettivo è dimostrare il beneficio clinico e definire il rapporto tra benefici e rischi. Gli studi sono generalmente randomizzati e controllati, con confronto rispetto allo standard terapeutico o a un trattamento attivo, e forniscono le evidenze necessarie per l'autorizzazione all'immissione in commercio da parte delle autorità regolatorie, come l'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) e l'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA).

Dopo l'autorizzazione all'immissione in commercio, il farmaco entra nella fase IV, o farmacovigilanza post-marketing. In questa fase il trattamento viene utilizzato nella pratica clinica su popolazioni più ampie ed eterogenee, consentendo di valutarne sicurezza e tollerabilità a lungo termine, con particolare attenzione all'identificazione di reazioni avverse rare non emerse negli studi precedenti. Vengono inoltre analizzati l'aderenza terapeutica e l'impatto reale del trattamento, al fine di confermare o ridefinire il rapporto beneficio-rischio. La fase IV comprende principalmente studi osservazionali, real world evidence, registri clinici e studi di utilizzo, i cui dati possono determinare aggiornamenti delle informazioni sul prodotto, restrizioni d'uso o estensioni delle indicazioni terapeutiche.

Questa progressione garantisce un rigoroso controllo dei rischi e un accumulo progressivo di conoscenze sul farmaco o sull'intervento in esame.

1.4.2 Organizzazione e conduzione dello studio clinico

La conduzione di uno studio clinico richiede il coordinamento strutturato di diverse figure professionali e istituzioni, ciascuna dotata di responsabilità specifiche finalizzate a garantire la validità scientifica del protocollo, la sicurezza dei partecipanti e la conformità normativa della sperimentazione.

Prima dell'avvio dello studio, il centro clinico è valutato dal promotore o da chi ne fa le veci, volta a verificare la disponibilità delle risorse necessarie per una conduzione adeguata e conforme ai principi delle Good Clinical Practice. Tale valutazione include l'analisi delle competenze del personale coinvolto, la disponibilità di strutture e attrezzature idonee, la capacità organizzativa del centro, la sostenibilità temporale del progetto e la presenza di una popolazione di pazienti potenzialmente eleggibile. Questo passaggio preliminare è essenziale

per assicurare che lo studio possa essere realizzato in condizioni di sicurezza, qualità e integrità metodologica.

Il promotore dello studio, ovvero lo sponsor, che può essere rappresentato da enti pubblici, istituzioni accademiche o aziende farmaceutiche, assume la responsabilità dell'iniziativa, del finanziamento e dell'organizzazione complessiva della sperimentazione. Tra i suoi compiti rientrano la supervisione della gestione dei dati, il monitoraggio dello studio, la garanzia della conformità alle normative vigenti e l'implementazione di sistemi di controllo qualità.

I ricercatori e il personale sanitario coinvolto nello studio svolgono un ruolo centrale nell'applicazione pratica del protocollo. Essi sono responsabili dell'arruolamento dei pazienti, dell'esecuzione delle procedure previste, della corretta raccolta e registrazione dei dati clinici e del monitoraggio della sicurezza dei partecipanti. La responsabilità clinica nei confronti dei pazienti rimane in capo allo sperimentatore principale, che deve assicurare il rispetto rigoroso delle procedure previste dal protocollo approvato, anche se può delegare alcune mansioni ad altre figure professionali.

Un ulteriore livello di controllo è esercitato dalle autorità regolatorie. In Italia tale funzione è svolta dall'Agenzia Italiana del Farmaco che supervisiona gli studi sul territorio, coordina le ispezioni e garantisce l'applicazione degli standard europei, oltre a definire classificazione e rimborsabilità dei farmaci. A livello europeo l'Agenzia Europea per i Medicinali coordina e supervisiona i processi autorizzativi e di farmacovigilanza, come EudraVigilance, verificando che gli studi clinici rispettino i requisiti di qualità, sicurezza ed efficacia previsti dalla normativa comunitaria [77]. Le autorità competenti operano in stretta interazione con i Comitati Etici, organismi indipendenti incaricati di valutare la solidità scientifica e l'accettabilità etica dei protocolli di studio, con particolare attenzione alla tutela dei diritti, della sicurezza e del benessere dei partecipanti.

1.4.3 Aspetti etici e Good Clinical Practice (GCP)

Le Good Clinical Practice (GCP) rappresentano lo standard etico e scientifico internazionale per la progettazione, conduzione e documentazione degli studi clinici che coinvolgono soggetti umani. Il loro obiettivo è duplice: tutelare diritti, sicurezza e benessere dei partecipanti e garantire qualità, integrità e affidabilità dei dati, affinché possano supportare decisioni regolatorie e cliniche basate su evidenze solide.

Le GCP si fondano su principi etici sviluppatisi nel tempo, a partire dal Codice di Norimberga (1947), che introdusse il consenso volontario e informato, e dalla Dichiarazione di Helsinki (1964), che sancì la priorità degli interessi del partecipante rispetto a quelli della scienza e l'obbligo di revisione indipendente dei protocolli. L'armonizzazione internazionale è avvenuta con la linea guida ICH E6 (1996), aggiornata nel 2016 con la versione E6(R2), che ha introdotto il monitoraggio basato sul rischio e il rafforzamento dei sistemi di qualità. A luglio del 2025 è stata pubblicata la revisione E6(R3 che promuove un approccio di *Quality by Design*, integrando la qualità già nella fase di progettazione dello studio.

Nei trial oncologici, caratterizzati da protocolli complessi, endpoint molecolari e gestione di campioni biologici, tale evoluzione normativa è particolarmente rilevante. La R3 consente di integrare tecnologie digitali e modelli organizzativi moderni, mantenendo centrale il principio cardine delle GCP: protezione del partecipante e affidabilità dei dati.

Le Good Clinical Practice attribuiscono ruoli e responsabilità ben definiti ai diversi attori della sperimentazione. Lo sperimentatore è responsabile della corretta conduzione dello studio presso il centro e della tutela della sicurezza dei pazienti, mentre il promotore garantisce la qualità complessiva del trial, il monitoraggio e la farmacovigilanza. I monitor verificano l'accuratezza e la tracciabilità dei dati raccolti e le autorità regolatorie, insieme ai Comitati Etici, esercitano una funzione di supervisione indipendente sul piano scientifico ed etico.

Le GCP impongono inoltre rigorosi standard per la protezione dei dati personali e per la segnalazione tempestiva degli eventi avversi. La qualità dei dati, secondo i principi ALCOA++, ovvero attribuibile, leggibile, contemporaneo, originale, accurato, completo, coerente, duraturo, disponibile, tracciabile, costituisce un ulteriore pilastro nell'attuale contesto di crescente digitalizzazione della ricerca.

1.4.4 Normativa della ricerca clinica

La ricerca clinica è disciplinata da un articolato quadro etico e normativo volto a garantire la tutela dei partecipanti e l'integrità scientifica degli studi. I principi fondamentali sono sanciti dalla Dichiarazione di Helsinki, che pone al centro il rispetto della persona, la valutazione del rapporto rischio-beneficio e l'equità nell'arruolamento. Tra i cardini etici rientrano il consenso informato libero e consapevole, la beneficenza intesa come massimizzazione dei benefici e riduzione dei rischi, e la "giustizia" nella selezione dei soggetti, evitando discriminazioni o

sfruttamento di popolazioni vulnerabili. In Italia, tali principi sono recepiti e integrati da normative nazionali che regolano autorizzazione, vigilanza e funzionamento dei Comitati Etici.

A livello europeo, la sperimentazione clinica dei medicinali è disciplinata dal Regolamento (UE) n. 536/2014, applicabile dal 31 gennaio 2022 e divenuto pienamente operativo al termine del periodo transitorio conclusosi il 31 gennaio 2025. Tale regolamento ha sostituito la Direttiva 2001/20/CE, eliminando le difformità interpretative tra gli Stati membri. Il Regolamento ha introdotto un sistema armonizzato e direttamente applicabile, riducendo la frammentazione normativa e semplificando la gestione dei trial multicentrici.

Elemento centrale della riforma è il Clinical Trials Information System (CTIS), piattaforma unica europea gestita dall'EMA, che consente allo sponsor di presentare un'unica domanda valida per più Stati membri. La valutazione è articolata in una Parte I comune, relativa agli aspetti scientifici e di sicurezza, e una Parte II nazionale, dedicata agli aspetti etici e locali. Questo modello favorisce coerenza decisionale, riduce duplicazioni e rende più prevedibili le tempistiche autorizzative. Il Regolamento promuove inoltre maggiore trasparenza, l'accesso pubblico ai risultati degli studi e introduce la categoria delle sperimentazioni a basso livello di intervento, con requisiti proporzionati al rischio.

Il Regolamento 536/2014 si integra con il GDPR, che disciplina la protezione dei dati personali raccolti negli studi, imponendo requisiti di riservatezza, sicurezza e tracciabilità. Nel complesso, l'attuale cornice etico-regolatoria configura un sistema armonizzato, digitale e orientato alla qualità, particolarmente rilevante per studi complessi e multicentrici, come quelli oncologici, nei quali sicurezza, qualità dei dati e tracciabilità rappresentano requisiti imprescindibili [78,79].

1.4.5 Ruolo della ricerca clinica nella medicina traslazionale

La ricerca clinica rappresenta un elemento cruciale nel continuum della medicina traslazionale, che mira a convertire le scoperte della ricerca di base in applicazioni cliniche concrete. Questo processo, spesso sintetizzato con l'espressione "bench-to-bedside", descrive il percorso attraverso cui le conoscenze generate in ambito laboratoristico vengono validate e applicate nella pratica clinica [80].

La ricerca di base, attraverso studi di biologia molecolare, genetica, biochimica e fisiopatologia, consente di identificare meccanismi patogenetici, potenziali target terapeutici e biomarcatori utili per la stratificazione dei pazienti. Tuttavia, tali evidenze necessitano di una fase di verifica in ambito clinico, in cui sicurezza, efficacia e applicabilità vengano valutate mediante studi metodologicamente rigorosi e regolamentati.

In questo contesto, la ricerca clinica funge da ponte tra la fase sperimentale in laboratorio e la pratica medica quotidiana, permettendo di testare nuove molecole, strategie terapeutiche e strumenti diagnostici in popolazioni selezionate, caratterizzate da eterogeneità biologica e variabilità individuale. Nei trial clinici, le ipotesi generate dalla ricerca preclinica vengono sottoposte a valutazione sistematica, con l'obiettivo di definire il profilo beneficio-rischio e di individuare sottogruppi di pazienti potenzialmente più responsivi al trattamento.

Particolarmente rilevante è il contributo della ricerca clinica allo sviluppo della medicina di precisione, fondata sulla caratterizzazione molecolare e genetica dei tumori e dei pazienti. In ambito oncologico, i progetti di ricerca traslazionale mirano a comprendere in modo sempre più approfondito i meccanismi molecolari alla base della carcinogenesi e della progressione tumorale, al fine di sviluppare strumenti prognostici, predittivi e terapeutici sempre più mirati.

Il successo della medicina traslazionale dipende pertanto dalla sinergia tra ricerca di base, sperimentazione clinica e innovazione tecnologica. Solo attraverso un sistema integrato e regolamentato è possibile garantire che le scoperte scientifiche si traducano in benefici concreti per i pazienti, migliorando gli esiti clinici e promuovendo un utilizzo più razionale e personalizzato delle risorse terapeutiche [81].

La ricerca clinica rappresenta un pilastro fondamentale per l'avanzamento della medicina e per il miglioramento degli esiti di salute. La sua complessità metodologica, l'attenzione costante ai principi etici e l'elevato livello di regolamentazione garantiscono la produzione di conoscenze affidabili, utili e trasferibili alla pratica sanitaria. Un'adequata comprensione di questi aspetti è essenziale per interpretare correttamente i risultati degli studi e contribuire allo sviluppo di interventi sempre più efficaci e sicuri.

2. SCOPO

Lo scopo del periodo di tirocinio svolto presso la Struttura di Oncologia Medica dell'Ospedale degli Infermi di Biella, nel periodo compreso tra aprile 2025 e marzo 2026, è stato quello di partecipare alla gestione dei pazienti arruolati nello studio Sagittarius, contribuendo all'applicazione del protocollo nel rispetto dei principi della Dichiarazione di Helsinki e degli standard delle Good Clinical Practice, con particolare attenzione al monitoraggio della sicurezza e alla segnalazione di eventuali reazioni avverse, incluse le reazioni avverse serie.

L'elaborato si propone di descrivere l'esperienza del centro nell'arruolamento dei 17 pazienti inclusi, analizzandone la distribuzione nei due trial previsti dal protocollo e nei rispettivi bracci di trattamento, nonché gli aspetti organizzativi e clinici connessi alla gestione della biopsia liquida, alla randomizzazione, al FU e alla valutazione della tollerabilità dei trattamenti. L'obiettivo è offrire una valutazione dell'applicazione del protocollo nella pratica clinica reale, considerando sia l'impatto della stratificazione molecolare e della determinazione del ctDNA nel processo decisionale adiuvante, sia le implicazioni in termini di sicurezza.

Poiché lo studio è attualmente in corso e la fase di arruolamento si concluderà nei prossimi mesi, l'analisi non intende fornire risultati conclusivi, ma proporre una riflessione sulle modalità di implementazione del protocollo e sulle sue implicazioni nella gestione reale dei pazienti.

3. MATERIALI e METODI

3.1 Procedure di screening

Tutti i pazienti potenzialmente candidabili allo studio vengono segnalati all'Ufficio Ricerca dai pre-ricoveri e l'oncologo di riferimento ne discuterà il caso alla riunione del Gruppo Interdisciplinare Cure (GIC). Ciò consente di avviare la verifica sistematica dei criteri di eleggibilità previsti dal protocollo.

3.1.1 Criteri di eleggibilità

Prima di considerare i pazienti idonei alla sperimentazione, devono essere soddisfatti tutti i seguenti criteri:

- Consenso informato scritto per la partecipazione allo studio;
- Età ≥ 18 anni;
- Diagnosi confermata istologicamente di carcinoma del colon in stadio III operabile e in stadio II ad alto rischio, localizzato ad almeno 12 cm dal margine anale mediante endoscopia e al di sopra della riflessione peritoneale durante l'intervento chirurgico;
- Disponibilità del tessuto tumorale FFPE originale;
- Performance status ECOG 0-1;
- Funzioni organiche normali;
- Le donne in età fertile (WOCBP) devono sottoporsi a un test di gravidanza ed essere disposte a utilizzare metodi contraccettivi altamente efficaci.

Devono essere considerati criteri di esclusione:

- Storia di un'altra malattia neoplastica, a meno che non sia in remissione da ≥ 5 anni. Non sono esclusi i partecipanti con carcinoma basocellulare della pelle, carcinoma squamocellulare della pelle o carcinoma in situ (ad esempio, carcinoma mammario, carcinoma cervicale in situ) che sono stati sottoposti a terapia potenzialmente curativa.
- Evidenza macroscopica o microscopica di tumore residuo (resezioni R1 o R2). I pazienti non devono aver mai avuto alcuna evidenza di malattia metastatica (compresa la presenza di cellule tumorali nel lavaggio peritoneale).
- Trattamento attuale o recente con un altro farmaco in fase di sperimentazione o partecipazione ad un altro studio in fase di sperimentazione.

- Paziente non in grado di rispettare il protocollo di studio per motivi psicologici, sociali o geografici.
- È incinta o sta allattando, o prevede di concepire o avere figli entro la durata prevista dello studio.
- Contraccezione inadeguata (pazienti maschi o femmine) se in et fertile o con potenziale procreativo.
- Malattia cardiovascolare clinicamente rilevante.
- Occlusione intestinale acuta o subacuta o storia di malattia infiammatoria intestinale o con qualsiasi altra malattia autoimmune.
- Neuropatia preesistente > grado 1. Reazione allergica nota di grado 3 o 4 ad uno dei componenti del trattamento.
- Ha una storia nota di virus dell'immunodeficienza umana (HIV). Nota: non richiesto il test HIV.
- Ha un'anamnesi nota di epatite B (definita come reattiva all'antigene di superficie dell'epatite B [HBsAg]) o un'infezione attiva nota da virus dell'epatite C.
Nota: non richiesto il test per l'epatite B e l'epatite C, a meno che non sia richiesto dalle autorit sanitarie locali.
- Ha una storia nota di TBC attiva (Bacillus Tuberculosis).
- Ha una condizione medica che controindica l'uso del medicinale in fase di sperimentazione (IMP) secondo le indicazioni del prodotto.
- Trattamento neoadiuvante somministrato prima dell'intervento chirurgico.

3.1.2 Consenso informato

Lo studio Sagittarius è condotto nel pieno e rigoroso rispetto dei principi etici della ricerca clinica, in conformità alla Dichiarazione di Helsinki, alle Good Clinical Practice (ICH-GCP) e alla normativa europea vigente in materia di sperimentazioni cliniche e protezione dei dati personali, come previsto dal protocollo ufficiale. In tale cornice regolatoria, l'acquisizione del consenso informato rappresenta un requisito imprescindibile e preliminare rispetto a qualsiasi procedura specifica di studio.

È responsabilità dello sperimentatore fornire a ciascun potenziale partecipante informazioni complete, chiare e comprensibili, sia in forma verbale sia scritta, riguardanti le finalità, il disegno, le procedure previste, nonché i potenziali rischi e benefici connessi alla partecipazione.

Il consenso deve essere ottenuto senza alcuna forma di coercizione, garantendo al paziente il tempo necessario per riflettere, porre domande e maturare una decisione libera e consapevole. Il partecipante deve essere inoltre informato della facoltà di ritirare il proprio consenso in qualunque momento, senza che ciò comporti alcuna conseguenza negativa sul percorso assistenziale.

La documentazione informativa destinata ai soggetti deve essere preventivamente approvata dal Comitato Etico/IRB competente e dalle Autorità Competenti e deve essere consegnata prima dell'esecuzione di qualunque procedura correlata allo studio. Il consenso informato è formalizzato mediante la firma datata del paziente, oppure, se necessario, del suo rappresentante legalmente e unitamente alla firma datata del medico. Una copia del modulo firmato e datato viene consegnata al partecipante, mentre l'originale è archiviato nella sezione riservata dell'Investigator Site File secondo le procedure di buona pratica clinica. Il modulo approvato non può essere modificato senza preventiva autorizzazione dello Sponsor, del Comitato Etico/IRB e delle Autorità Competenti.

Nel corso dello studio, qualora emergano nuove informazioni potenzialmente rilevanti ai fini della prosecuzione della partecipazione, i soggetti ancora in trattamento devono essere tempestivamente informati e invitati a sottoscrivere una versione aggiornata del consenso informato o un addendum al documento originario. Nel caso in cui un partecipante divenga incapace di esprimere validamente il proprio consenso durante lo svolgimento dello studio, la prosecuzione potrà avvenire solo previo ottenimento dell'autorizzazione da parte di un rappresentante legalmente riconosciuto.

Le tempistiche di acquisizione del consenso sono integrate nell'organizzazione del percorso post-operatorio, al fine di garantire l'avvio del trattamento adiuvante entro otto settimane dall'intervento chirurgico, come previsto dal protocollo. I pazienti che ritirano il consenso prima della randomizzazione, che presentano una recidiva precoce o che non sono in grado di iniziare la terapia entro i tempi stabiliti, ad esempio per ritardi nella disponibilità del risultato della biopsia liquida (LB-A), vengono classificati come screening failures secondo protocollo.

La tutela dei dati personali è assicurata attraverso un sistema di pseudonimizzazione mediante l'assegnazione di un codice identificativo univoco IT-SAG-009-000X, con separazione tra dati anagrafici e dati clinico-sperimentali e accesso consentito esclusivamente al personale autorizzato. Tutti i campioni biologici sono etichettati esclusivamente con il codice del paziente

e gestiti secondo procedure di sicurezza e tracciabilità conformi alla normativa vigente e alle disposizioni del protocollo.

3.1.3 Screening molecolare

A seguito dell'ottenimento del consenso informato scritto e della verifica preliminare dei criteri di eleggibilità, il paziente entra nella fase di screening molecolare, che rappresenta uno snodo cruciale dell'intero percorso sperimentale. In conformità con il protocollo, tutte le procedure devono essere organizzate in modo da consentire l'avvio del trattamento adiuvante entro otto settimane dall'intervento chirurgico, in linea con le raccomandazioni cliniche correnti.

Il primo passaggio è la conferma istologica definitiva di carcinoma del colon in stadio III o in stadio II ad alto rischio, criterio essenziale di inclusione nello studio, pervenuta tramite la creazione da parte dell'Anatomia Patologica dell'Ospedale degli Infermi di Biella di percorsi prioritari così confermare la stadiazione entro tre settimane dalla chirurgia. Dalla stessa vengono selezionati e preparati i campioni di tessuto tumorale fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE), nel rispetto dei criteri preanalitici indicati, ovvero assenza di necrosi estesa, adeguata cellularità tumorale $\geq 20-30\%$, tempi di fissazione non superiori a 72 ore.

Il materiale tumorale viene quindi suddiviso in due flussi distinti:

- Campioni destinati a Natera® (Signatera™) per la costruzione del test tumor-informed:
 - 6–10 sezioni FFPE non colorate da 10 μm (oppure 12–20 da 5 μm),
 - 1 vetrino H&E contiguo,
 - copia anonimizzata del referto anatomo-patologico.

- Campioni destinati a Cogentech per la Comprehensive Genomic Profiling:
 - 5 sezioni FFPE (rolls) da 5 μm in Eppendorf,
 - 1 vetrino H&E contiguo,
 - ulteriori sezioni per eventuali analisi aggiuntive (es. MGMT),
 - referto istologico anonimizzato.

Il ruolo dell'anatomopatologo è cruciale: egli deve confermare l'adeguata cellularità tumorale, l'integrità del campione e l'assenza di eccessiva necrosi o contaminazione stromale, al fine di garantire un'estrazione di DNA di qualità sufficiente per l'analisi genomica.

In aggiunta solo per Natera, si ha la necessità di fornire

- 1 provetta Vacutainer® K2-EDTA da 6 mL pre-etichettata per la raccolta di sangue intero (*Figura 7*),
- 2 provette pre-etichettate da 10 ml Streck Cell-Free DNA BCT per il prelievo di sangue intero (*Figura 8*).

Dopo il prelievo, le provette vengono mantenute a temperatura ambiente secondo le indicazioni del produttore e processate nei tempi stabiliti dal protocollo. Il plasma viene ottenuto mediante centrifugazione controllata, quindi aliquotato e conservato in congelatore a -80°C fino alla spedizione.

Segue poi la fase di preparazione alla spedizione, che prevede l'inserimento corretto del materiale biologico insieme alla documentazione richiesta, compilando accuratamente tutti i moduli previsti dal protocollo, secondo le norme per il trasporto di materiale biologico.



Figura 7. Provetta Vacutainer® K2-EDTA da 6 mL pre-etichettata



Figura 8. Provette per l'analisi del ctDNA

3.1.4 Comprehensive Genomic Profiling del tessuto tumorale

L'analisi genomica avviene tramite il test TruSight™ Oncology Comprehensive (TSO) di Illumina, una piattaforma di sequenziamento di nuova generazione NGS, a pannello mirato, progettata per la caratterizzazione molecolare estesa di campioni tumorali FFPE che consente l'analisi simultanea di fino a 517 geni rilevanti, mediante tecnologia hybrid-capture e sequenziamento su piattaforma Illumina NextSeq 550Dx (*Figura 9*). Il test può essere utilizzato per rilevare varianti del DNA: varianti a singolo nucleotide, varianti a più nucleotidi, inserzioni, delezioni e amplificazioni geniche.

Nello studio la determinazione dello stato MMR e MSI costituisce il primo livello gerarchico della stratificazione molecolare e rappresenta il criterio prioritario nell'algoritmo di assegnazione terapeutica.



Figura 9. The NextSeq 550Dx System, TruSight Oncology Comprehensive (EU), 2017

L'elaborazione dei dati molecolari porta alla generazione di un report genomico, generalmente disponibile entro qualche settimana, trasmesso al centro clinico garantendo la protezione dei dati sensibili e la conformità alle normative sulla privacy. In *Figura 10* è riportata la gerarchia di stratificazione e associazione terapia-biomarcatore.

L'intero processo rappresenta un percorso integrato che collega la valutazione istopatologica iniziale alla caratterizzazione genomica approfondita del tumore, elemento centrale per l'eventuale stratificazione terapeutica personalizzata [82].

Infatti, per le casistiche di ctDNA positivi con MSI-H/MMRd, caratterizzati da elevato carico mutazionale e maggiore immunogenicità, vengono direttamente indirizzati a un approccio immunoterapico con nivolumab associato a ipilimumab, nell'ambito dello STRATA-2, in virtù della consolidata sensibilità di questo sottogruppo agli inibitori dei checkpoint immunitari.

Nei tumori MSS/MMRp, la stratificazione prosegue secondo una sequenza predefinita di biomarcatori. In primo luogo, viene valutato lo stato mutazionale di POLE e il TMB: i tumori POLE-mutati con TMB elevato vengono assimilati, sul piano biologico, ai tumori MSI-H e assegnati anch'essi allo STRATA-2 con trattamento immunoterapico. In assenza di tali caratteristiche, l'algoritmo procede con l'analisi delle mutazioni di KRAS, NRAS e BRAF. I tumori con mutazioni RAS/RAF vengono allocati allo STRATA-1 e trattati con chemioterapia convenzionale CAPOX/FOLFOX.

Nei casi RAS/RAF wild-type, viene successivamente valutata l'eventuale amplificazione di HER2, che orienta verso una strategia anti-HER2, trastuzumab in associazione a pertuzumab nello STRATA-2. I tumori privi di alterazioni MSI, POLE, RAS/RAF e HER2 multiple wild-type, vengono infine indirizzati a combinazioni di chemioterapia e terapia anti-EGFR, ovvero FOLFOX in associazione a panitumumab.

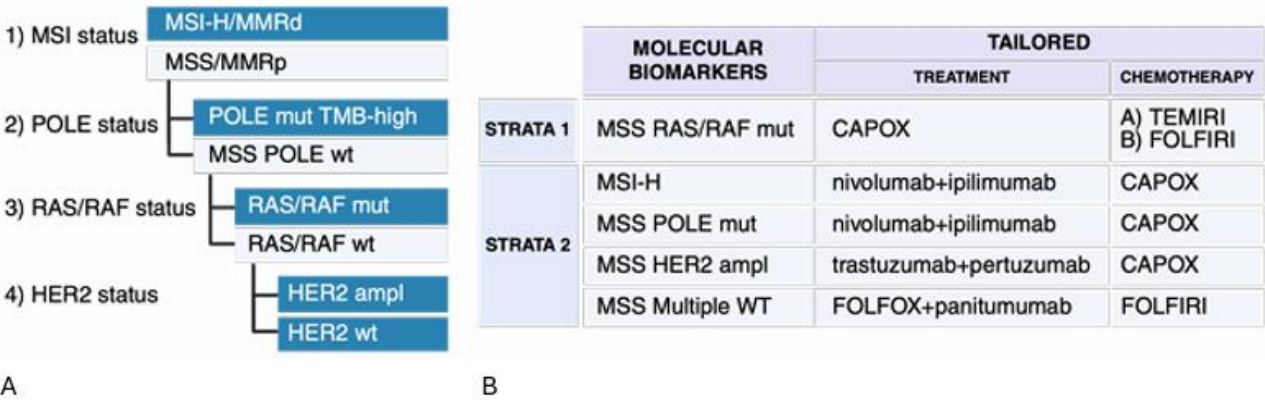


Figura 10. A- Fattori di stratificazione basati su biomarcatori molecolari con priorità gerarchiche dei biomarcatori. B- Trattamento personalizzato e chemioterapia associati a ciascun sottotipo tumorale. IFOM, 2024

Questa stratificazione molecolare gerarchica trova la sua applicazione più articolata nei pazienti ctDNA-positivi, nei quali il profilo genomico del tumore orienta direttamente l’assegnazione a specifiche strategie terapeutiche personalizzate. Tuttavia, il principio che ne è alla base non riguarda esclusivamente questo sottogruppo. L’integrazione tra caratteristiche biologiche intrinseche del tumore e stato di MRD rappresenta, infatti, il fulcro concettuale dello studio: nei pazienti ctDNA-positivi la biologia molecolare guida la scelta del trattamento più appropriato, mentre nei pazienti ctDNA-negativi è l’assenza di MRD a sostenere una possibile de-escalation dell’intervento adiuvante.

3.1.5 Costruzione del test tumor-informed

Il test Signatera™ per la valutazione della MRD si basa su un approccio *tumor-informed* altamente personalizzato (Figura 11). A partire dal tessuto tumorale fissato in FFPE, viene eseguito il Whole Exome Sequencing (WES) per identificare in modo sistematico le mutazioni somatiche presenti nell’intero esoma. In parallelo, un campione di sangue periferico viene

analizzato per definire il profilo germinale del paziente, consentendo di distinguere le varianti somatiche tumorali da quelle costituzionali ed escludere interferenze legate all'emopoiesi clonale (CHIP) [83].



Figura 11. Flusso di lavoro del test Signatera™ per la rilevazione della MRD. A- Paziente con lesione. B- Identificazione dei marcatori. C- Elaborazione dei dati. Reinert T, Henriksen TV, Christensen E, et al. *Clinical Cancer Research*, 2021

Dal confronto tra profilo tumorale e germinale viene costruita una firma molecolare personalizzata, selezionando generalmente sedici varianti clonali ad alta confidenza rappresentative del clone tumorale dominante. Queste mutazioni costituiscono il target di un test ematico su misura per il monitoraggio longitudinale. Il cfDNA, estratto dal plasma ottenuto mediante prelievi seriali, viene sottoposto a sequenziamento ultra-profondo mirato esclusivamente alle varianti identificate. Un campione è considerato positivo quando vengono rilevate almeno due mutazioni tumorali specifiche, indicando la presenza di ctDNA [84].

L'approccio tumor-informed consente una rilevazione altamente sensibile e specifica della malattia residua molecolare rispetto ai test tumor-agnostic, poiché traccia mutazioni personali del tumore del singolo paziente. Studi clinici prospettici hanno dimostrato che la positività del ctDNA dopo trattamento chirurgico è fortemente associata al rischio di recidiva e può precedere l'evidenza radiologica di malattia [85]. In questo contesto, il monitoraggio dinamico del ctDNA assume un rilevante valore prognostico e un potenziale ruolo di supporto nelle decisioni terapeutiche adiuvanti.

3.1.6 Cellule mononucleate del sangue periferico: PBMC

La raccolta dei campioni biologici rappresenta un elemento strutturale del disegno di studio, in quanto integra analisi genomiche tumorali, monitoraggio dinamico del ctDNA e studi

traslazionali sul compartimento immunitario periferico. Dopo il prelievo ematico, eseguito secondo le tempistiche previste dal protocollo, il campione viene processato presso il centro clinico mediante separazione delle sue componenti principali.

Lo studio del PBMC rappresenta una risorsa biologica strategica per comprendere il contesto immunologico e sistemico in cui si inserisce la malattia residua. L'analisi del PBMC può consentire valutazioni immunofenotipiche, studi sulla risposta immune correlata alla clearance o persistenza del ctDNA e, dove necessario, la caratterizzazione di fenomeni quali la clonal hematopoiesis, potenzialmente interferenti con l'interpretazione delle varianti circolanti. In tal modo, la componente cellulare periferica integra l'informazione genomica tumorale e quella derivante dalla biopsia liquida.

3.1.7 Campione fecale e tampone buccale

La raccolta dei tamponi buccali (*Figura 12*) per lo studio del microbiota orale è prevista in entrambi i trial, ma con una diversa articolazione temporale. Al paziente verrà fornito un kit per la raccolta insieme a istruzioni dettagliate.

Nel Trial-1, viene eseguito in fase post-chirurgica in corrispondenza di LB-A (entro 28 giorni dall'intervento), in linea con la finestra temporale prevista per la fase basale. Successivamente, la raccolta è programmata:

- a 3 mesi dopo CAPOX oppure a 3 mesi dopo tailored therapy (TT);
- a 6 mesi dopo CAPOX oppure a 6 mesi dopo TT o chemioterapia;
- al momento della eventuale recidiva.

Dal protocollo si evince inoltre che le valutazioni di FU possono proseguire fino a 5 anni dall'arruolamento, con controlli ogni 6 mesi fino a 3 anni, e che in caso di relapse è prevista una nuova raccolta biologica, includente anche il tampone buccale.

Nel Trial-2 la raccolta del *buccal swab* è più limitata ed è prevista:

- in fase post-chirurgica;
- al momento della possibile recidiva.



Figura 12. Tampone buccale

Per quanto riguarda il campione fecale emerge una programmazione più strutturata rispetto al buccal swab, in particolare nel Trial-1.

Nel Trial-1 il campione fecale viene raccolto in più momenti lungo il percorso terapeutico:

- Post-chirurgia (LB-A), entro 28 giorni dall'intervento (fase basale).
- Durante il trattamento, in corrispondenza delle liquid biopsy intermedie (LB-B e LB-C), in relazione ai tempi di:
 - CAPOX (3 e 6 mesi),
 - TT (3 e 6 mesi).
- In fase successiva al trattamento sistemico (inclusa eventuale chemioterapia o TT).
- Al momento della recidiva, se presente.

La logica del Trial-1 è quindi longitudinale: il campione fecale viene raccolto in parallelo agli altri campioni biologici (liquid biopsy e, ove indicato, tessuto tumorale), per consentire un'analisi dinamica del microbiota intestinale durante le diverse fasi del trattamento e dell'eventuale progressione.

Nel Trial-2, la raccolta del campione fecale è più limitata e segue uno schema analogo a quello del buccale:

- Post-chirurgia (LB-A), nella finestra basale entro 28 giorni.
- Al momento della recidiva, qualora si verifichi.

Non sono previste raccolte intermedie programmate durante la chemioterapia (FOLFOX/CAPOX) né durante la fase di Intensivo FU in associazione a CAPE.

Anche per il campione fecale (*Figura 13*), quindi, il Trial-1 ha un disegno traslazionale più articolato e dinamico, mentre il Trial-2 prevede un monitoraggio biologico più essenziale.



Figura 13. Campione fecale

La raccolta di campioni biologici sarà effettuata secondo procedure operative standard (SOP) dedicate, come descritto nel Manuale delle Procedure (MOP), nel rispetto del calendario previsto dal Diagramma di Flusso dello Studio. Il materiale residuo eventualmente disponibile al termine delle analisi previste dal protocollo potrà essere impiegato per ulteriori approfondimenti scientifici, quali l'identificazione di nuovi marcatori farmacodinamici o predittivi, nonché per ampliare le conoscenze sulla biologia della malattia. Tali studi saranno

sempre privi di finalità commerciali e orientati ad approfondire la biologia del carcinoma del colon-retto, i meccanismi di progressione ed evoluzione tumorale e lo sviluppo di strategie terapeutiche sempre più mirate ed efficaci. Il consenso all'eventuale utilizzo futuro dei campioni e dei dati è esplicitamente previsto e documentato nei moduli di Consenso Informato. La conservazione dei campioni raccolti presso ciascun centro clinico sarà centralizzata presso il biorepository dello Sponsor, IFOM.

3.2 Randomizzazione

La randomizzazione avviene in aperto ed è centralizzata con rapporto di allocazione 1:1, in base alle caratteristiche molecolari del tumore di ciascun paziente: MSS/MMRp con mutazione estesa di RAS/RAF, e MSI-H/MMRd o MSS/MMRp tipo wild type RAS/RAF.

Perciò una volta acquisito il consenso informato scritto, completate le procedure di screening previste dal protocollo ed effettuate tutte le valutazioni necessarie a confermare l'eleggibilità del paziente, il centro sperimentale procederà, tramite il sistema CRF (*Paragrafo 3.4 Case report form*), all'assegnazione del numero identificativo univoco e alla randomizzazione del trattamento secondo l'allocazione prevista dal protocollo.

La randomizzazione sarà effettuata utilizzando un metodo di allocazione dinamica basato sulla minimizzazione, con l'obiettivo di mantenere i gruppi di trattamento il più possibile equilibrati rispetto a importanti fattori prognostici. In questo modo si evita che uno dei due bracci includa, per esempio, un numero maggiore di pazienti con caratteristiche biologiche più sfavorevoli, situazione che potrebbe influenzare i risultati dello studio.

L'utilizzo di questo sistema consente quindi di garantire una distribuzione più omogenea delle principali variabili cliniche e molecolari tra i gruppi, riducendo il rischio che eventuali differenze negli esiti siano dovute a squilibri iniziali piuttosto che all'effetto del trattamento stesso.

I fattori inclusi nell'algoritmo di minimizzazione saranno: il centro clinico, lo stato del ctDNA e il profilo mutazionale tumorale. L'adozione di tale metodo consente di garantire una distribuzione bilanciata dei principali determinanti biologici, quali lo stato MSI-H/MMRd, la presenza di mutazioni POLE e lo stato mutazionale RAS/RAF, nonché di controllare eventuali

variabili legate al centro sperimentale, incluse le specificità delle procedure chirurgiche e delle strategie oncologiche adottate.

Questo approccio mira, pertanto, a ridurre al minimo il rischio di bias derivanti sia da fattori biologici intrinseci, potenzialmente associati al rischio di recidiva, sia da fattori organizzativi o operatori, che potrebbero influire sugli esiti clinici e sui profili di sicurezza.

A ciascun paziente eleggibile verrà attribuito un numero identificativo e assegnato in modo casuale a uno dei gruppi di trattamento, considerando lo stato del ctDNA post-operatorio e il profilo genomico del tumore primitivo. L'assegnazione seguirà una lista di randomizzazione stratificata predefinita e, inoltre, pazienti che interromperanno lo studio dopo la randomizzazione non verranno sostituiti.

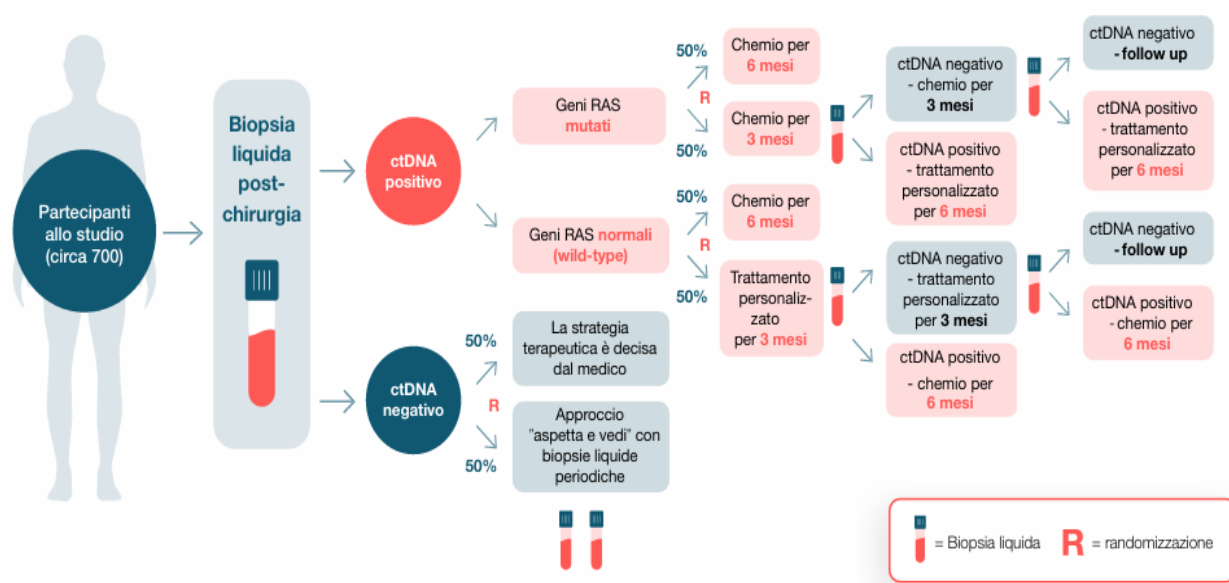


Figura. 14. Rappresentazione dell'analisi longitudinale del disegno sperimentale con stratificazione dei pazienti (da IFOM, 2024)

Come si evince dalla Figura 14, il processo di randomizzazione previsto dal protocollo non si esaurisce al momento basale, ma assume una configurazione dinamica e longitudinale.

Nel corso del trattamento, infatti, la valutazione seriale del ctDNA mediante biopsia liquida costituisce un momento critico di rivalutazione biologica della malattia residua molecolare. Il risultato di tali determinazioni può determinare una modifica dell'allocazione terapeutica iniziale, configurando di fatto una ri-stratificazione o uno "switch" terapeutico guidato dal

biomarcatore. In questo senso, la biopsia liquida non svolge un ruolo puramente prognostico o di monitoraggio, ma diviene uno strumento decisionale attivo che orienta in modo continuo la strategia terapeutica.

Pertanto, nel sottogruppo ctDNA+, la randomizzazione deve essere interpretata come un processo sequenziale, integrato da valutazioni molecolari ripetute nel tempo, consentendo l'intensificazione del trattamento in caso di persistenza della positività o, al contrario, il completamento del percorso previsto in caso di sierconversione stabile.

Anche nei pazienti ctDNA-negativi al baseline (LB-A), il monitoraggio seriale del ctDNA riveste un ruolo cruciale, in considerazione della possibilità, seppur limitata, di risultati falsamente negativi o di una positivizzazione molecolare tardiva. Come evidenziato dal protocollo, nei soggetti assegnati al braccio di FU intensivo sono previste ulteriori biopsie liquide (LB-D e LB-E) rispettivamente a 2 e 4 mesi, finalizzate proprio a intercettare precocemente un'eventuale comparsa di malattia molecolare residua.

L'identificazione di una nuova positività comporta, secondo protocollo, la transizione al Trial-1 con conseguente rivalutazione terapeutica. Questo rende il controllo temporale delle scadenze previste un elemento essenziale della conduzione dello studio.

In tale contesto, il ricercatore clinico è tenuto non solo a programmare con precisione i prelievi ematici secondo le finestre temporali stabilite, ma anche a informare e richiamare attivamente il paziente in prossimità delle scadenze previste, garantendo l'aderenza al calendario degli esami biologici e assicurando la tempestiva gestione di eventuali variazioni dello stato molecolare.

3.3 Struttura dello studio: Trial-1 e Trial-2

I pazienti intraprenderanno percorsi personalizzati e coordinati dal ricercatore clinico in base a questi timepoints fondamentali.

Come si evince dalla *Figura 15*, i pazienti con positività del ctDNA alla biopsia liquida post-operatoria, indicativa di malattia molecolare residua, rientrano nel Trial-1. In questo sottogruppo, caratterizzato da elevato rischio biologico di recidiva, l'obiettivo è ottimizzare l'efficacia terapeutica attraverso un approccio personalizzato.

Prima della randomizzazione, i pazienti vengono ulteriormente stratificati in base al profilo molecolare tumorale:

- STRATA-1: tumori MSS/MMRp con mutazioni di RAS/RAF;
- STRATA-2: tumori MSI-H/MMRd oppure MSS/MMRp RAS/RAF wild-type.

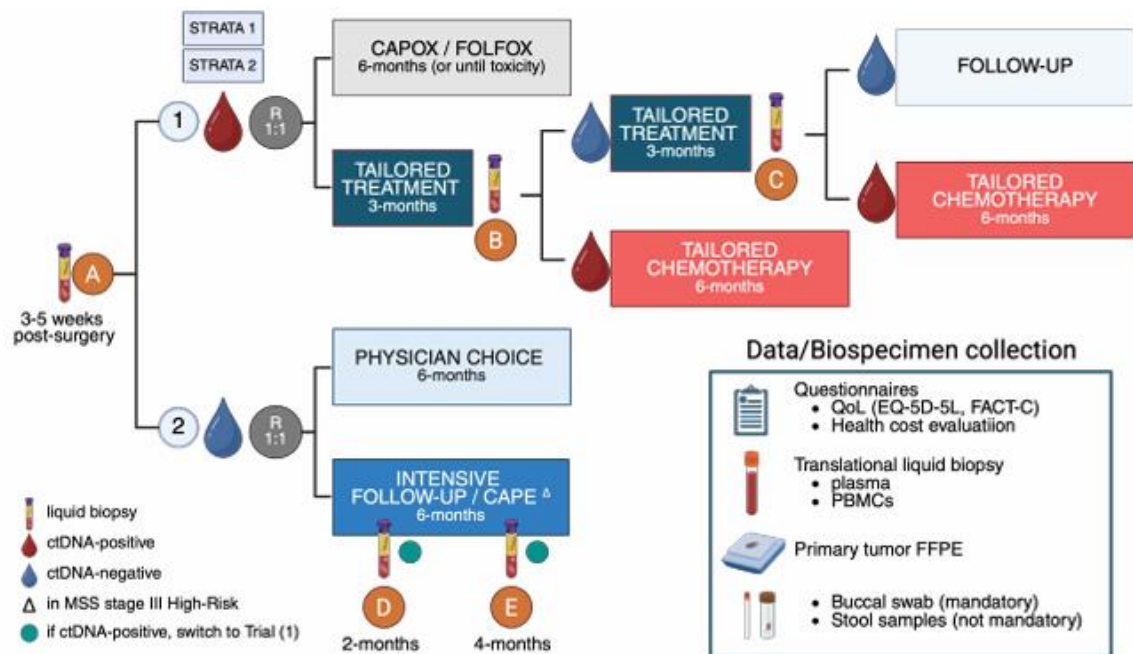


Figura 15. Sagittarius trial design schema (da IFOM, 2024)

All'interno di ciascuno strato è prevista una randomizzazione 1:1 tra:

- Braccio convenzionale, con chemioterapia adiuvante standard, ovvero CAPOX o FOLFOX fino a 6 mesi o fino a tossicità;
- Braccio sperimentale personalizzato, con strategie terapeutiche modulabili sulla base delle caratteristiche molecolari del tumore e della dinamica del ctDNA.

Nel braccio sperimentale, la biopsia liquida, LB-B e LB-C, viene ripetuta in momenti prestabiliti per valutare la clearance o la persistenza del ctDNA. La permanenza della positività può determinare un crossover terapeutico verso regimi alternativi o terapie target, mentre la negativizzazione consente la prosecuzione del trattamento secondo protocollo. In questo

contesto, il ctDNA assume un ruolo non solo prognostico ma decisionale, guidando dinamicamente l'intensificazione o la modulazione della terapia.

I pazienti con ctDNA negativo alla LB-A, presumibilmente privi di MRD, rientrano nel Trial-2. In questa popolazione, a rischio biologico inferiore, il razionale è valutare la possibilità di ridurre l'esposizione a chemioterapia senza compromettere gli esiti clinici.

Anche in questo braccio la randomizzazione è 1:1 tra:

- Braccio convenzionale, con chemioterapia adiuvante scelta dal medico secondo pratica clinica, ovvero CAPE, CAPOX, FOLFOX o 5-FU ± leucovorina;
- Braccio sperimentale di de-escalation, consistente in FU intensivo, fatta eccezione dei pazienti MSS stadio III ad alto rischio che verranno trattati con capecitabina.

Anche in questo trial sono previste biopsie liquide intermedie, LB-D e LB-E, a 2 e 4 mesi, con l'obiettivo di intercettare eventuali sieroconversioni. In caso di nuova positività del ctDNA, il paziente viene spostato nel Trial-1, entrando nel percorso di intensificazione terapeutica.

3.4 Case report form

Per ciascun paziente arruolato, il centro sperimentale è responsabile della compilazione della eCRF in modo tempestivo, accurato ed autentico. La eCRF costituisce il documento ufficiale di registrazione dei dati relativi a:

- dati demografici e anamnestici,
- criteri di eleggibilità,
- risultati della profilazione molecolare e del test ctDNA,
- dettagli della randomizzazione,
- trattamenti somministrati,
- eventi avversi,
- esami di laboratorio e strumentali,
- questionari di qualità di vita,
- outcome clinici come recidiva, sopravvivenza, stato vitale.

Tutte le informazioni registrate sul portale elettronico sono anche conservate in forma cartacea come source documents presso l'ufficio di ricerca clinica dell'ospedale e sono fonte di validazione in caso di monitoraggio.

L'inserimento dei dati deve essere effettuato dal personale autorizzato dallo sperimentatore principale del centro, generalmente il coordinatore di ricerca clinica, entro le tempistiche previste dal protocollo, al fine di garantire l'aggiornamento continuo del database centrale. Inoltre, eventuali correzioni successive devono essere giustificate e registrate automaticamente dal sistema, mantenendo traccia della versione precedente, della data e dell'operatore che ha effettuato la modifica. Questo sistema riduce il rischio di errori di trascrizione e garantisce la qualità del database finale utilizzato per le analisi statistiche.

La piattaforma elettronica è dotata di sistemi di sicurezza con accesso tramite credenziali personali, audit trail automatico e tracciabilità di ogni modifica apportata, assicurando così integrità e non modificabilità non autorizzata delle informazioni.

A verificare la completezza e l'attendibilità dei dati sarà il clinical monitor. Infatti, le visite di monitoraggio presso il sito dello studio saranno effettuate periodicamente durante il trial da un monitor qualificato per verificare che il trial sia condotto secondo il protocollo di studio, i principi di GCP e i requisiti normativi. A queste visite è importante che il ricercatore clinico sia presente e disponibile a fornire al monitor tutti i source documents e gli investigator site file dello studio.

3.5 Esami clinici

Il ricercatore clinico riveste un ruolo centrale nel coordinamento operativo tra laboratorio analisi, servizio di radiologia e unità di oncologia medica, garantendo l'integrazione delle diverse attività assistenziali con le procedure previste dal protocollo di studio. In tale contesto, è sua responsabilità assicurare la rigorosa applicazione delle disposizioni protocollari in funzione della specifica casistica del paziente, pianificando e monitorando l'esecuzione degli accertamenti previsti dal protocollo che possono seguire tempistiche diverse dalla normale pratica clinica.

3.5.1 Radiologia

L'imaging radiologico rappresenta lo strumento principale per la documentazione oggettiva di recidiva ed è direttamente correlato alla determinazione della RFS. Al baseline, verrà programmata per tutti i pazienti entro 28 giorni dall'intervento chirurgico (± 7 giorni), prima dell'inizio del trattamento, in modo da costituisce il riferimento radiologico iniziale.

La valutazione mediante imaging sarà programmata al baseline e successivamente:

- ogni 3 mesi fino al secondo anno, poi ogni 6 mesi fino al quinto anno nei pazienti con ctDNA+ alla prima LB.
- ogni 6 mesi fino al secondo anno, poi una volta all'anno fino al quinto anno, nei pazienti con ctDNA- alla prima LB.

Per garantire la massima riproducibilità delle valutazioni radiologiche nel corso dello studio, per ciascun partecipante dovrebbe essere utilizzata la medesima metodica di imaging, preferibilmente con lo stesso apparecchio e con modalità di acquisizione sovrapponibili, inclusa l'eventuale somministrazione di mezzo di contrasto. Tale uniformità tecnica consente di ottimizzare la comparabilità delle immagini nel tempo secondo i criteri RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors), migliorando l'accuratezza nella stima del carico tumorale, nell'identificazione di nuove lesioni e nella valutazione della risposta o della progressione di malattia.

In conformità alle linee guida RECIST versione 1.1, al baseline dovranno essere identificate e misurate le lesioni target, selezionandone un massimo di 5 in totale e non più di 2 per organo, scegliendo quelle con diametro maggiore e misurabili in maniera riproducibile: diametro minimo ≥ 10 mm alla TC con strato ≤ 5 mm, i linfonodi patologici definibili come target solo se con asse corto ≥ 15 mm. Le altre lesioni patologiche saranno classificate come non-target. Le valutazioni successive dovranno prevedere la misurazione seriale delle sole lesioni target con calcolo della somma dei diametri maggiori, da confrontare con il valore basale.

La risposta obiettiva sarà definita secondo i criteri standard:

- Risposta Completa (CR): scomparsa di tutte le lesioni target (linfonodi con asse corto < 10 mm);
- Risposta Parziale (PR): riduzione $\geq 30\%$ della somma dei diametri rispetto al baseline;

- Malattia Progressiva (PD): incremento $\geq 20\%$ della somma dei diametri rispetto al nadir (con aumento assoluto ≥ 5 mm) e/o comparsa di nuove lesioni;
- Malattia Stabile (SD): assenza dei criteri per PR o PD.

La comparsa di nuove lesioni determina progressione di malattia indipendentemente dalle variazioni dimensionali delle lesioni preesistenti. Le lesioni non-target saranno valutate qualitativamente, solo come presenti o non presenti.

Tutte le immagini acquisite vengono archiviate dal ricercatore come source documents in forma anonimizzata e conservate per eventuali revisioni centralizzate post-studio, in linea con le raccomandazioni di revisione indipendente previste dai criteri RECIST, e per analisi radiomiche successive [86].

3.5.2 Colonscopia

In merito alla colonscopia, sarà programmata entro 1 anno dall'intervento chirurgico, poi se negativa ogni 3-5 anni, o secondo pratica clinica.

3.5.3 Antigene carcinoembrionale (CEA)

Un ulteriore esame di controllo è l'antigene carcinoembrionale (CEA), un marcatore biochimico di supporto al monitoraggio della malattia. La valutazione dei livelli sierici di CEA sarà effettuata per entrambi i trial durante la visita del baseline, successivamente ogni 3 mesi per i primi due anni, poi ogni 6 mesi fino al quinto anno dall'arruolamento. Inoltre, i livelli di CEA saranno valutati durante le visite per recidiva o ritiro del consenso.

3.6 Questionari e diari

In conformità con i timepoint previsti dal protocollo, al fine di garantire equità di accesso e inclusione, ai pazienti che non dispongano di adeguate competenze digitali o che preferiscano una modalità tradizionale viene fornita la versione cartacea dei questionari: FACT-C, EQ-5D-5L, Health Cost Questionnaire. I questionari compilati verranno riconsegnati dal paziente alla visita seguente e quindi inseriti in CRF dagli operatori.

La raccolta sistematica dei dati riferiti direttamente dal paziente rappresenta una componente metodologica essenziale, volta a integrare gli endpoint clinici tradizionali con una valutazione multidimensionale dell'impatto del trattamento. Oltre agli indicatori di efficacia oncologica, quali la recurrence-free survival e la overall survival, il protocollo prevede infatti l'analisi della qualità di vita, della tollerabilità percepita, dell'impatto economico e di alcune variabili comportamentali, con l'obiettivo di fornire una visione complessiva e real-world dell'esperienza terapeutica.

In particolare, il questionario FACT-C (Functional Assessment of Cancer Therapy – Colorectal) consente un'analisi specifica per il carcinoma coloretale, esplorando dimensioni fisiche, funzionali, emotive e sociali correlate alla patologia e ai trattamenti oncologici. A esso si affianca l'EQ-5D-5L, strumento generico di valutazione dello stato di salute percepito e utile anche per analisi di costo-utilità. Infine, Health Cost Questionnaire valuta l'impatto economico sulla vita del paziente.

È inoltre previsto un questionario di monitoraggio delle abitudini alimentari, finalizzato a raccogliere dati sugli stili di vita e sui possibili fattori nutrizionali correlati alla prognosi e alla risposta al trattamento. Questo elemento si inserisce nella dimensione traslazionale dello studio, che mira a integrare parametri biologici, clinici e comportamentali in un modello interpretativo più ampio della malattia.

In entrambi i trial, la valutazione inizia al baseline, in concomitanza con la visita pre-adiuvante e con la biopsia liquida post-operatoria (LB-A). In questa fase vengono somministrati il FACT-C, l'EQ-5D-5L e l'Health Cost Questionnaire, al fine di documentare lo stato di salute percepito, la qualità di vita specifica per carcinoma coloretale e l'impatto economico prima dell'avvio di qualsiasi trattamento adiuvante o strategia di FU.

Nel Trial-1, durante la fase di trattamento adiuvante, sia nel braccio convenzionale sia in quello sperimentale personalizzato, la raccolta è intensiva e regolare. L'EQ-5D-5L viene compilato con cadenza settimanale, permettendo una rilevazione ravvicinata delle variazioni dello stato di salute percepito, mentre il FACT-C e l'Health Cost Questionnaire vengono somministrati con periodicità mensile.

Nel Trial-2, la tempistica è analoga nei pazienti che ricevono un trattamento attivo, con EQ-5D-5L settimanale e FACT-C e Health Cost Questionnaire mensili durante il periodo terapeutico. Nei pazienti assegnati alla strategia di intensive FU senza trattamento, la

compilazione non segue la cadenza settimanale, ma è collegata alle visite programmate, mantenendo comunque la rilevazione periodica prevista dal protocollo.

Nella fase di FU, comune a entrambi i trial, tutti i questionari vengono somministrati ogni tre mesi fino a tre anni dall'arruolamento, consentendo una valutazione prospettica a medio termine dell'impatto delle diverse strategie terapeutiche. Il monitoraggio dello stato di sopravvivenza prosegue fino a cinque anni, in linea con gli endpoint di sopravvivenza previsti dal protocollo.

Per i pazienti trattati con capecitabina orale è obbligatoria anche la compilazione del 'Diario Paziente Capecitabina', strumento fondamentale per il monitoraggio dell'aderenza terapeutica. Il trattamento con capecitabina è organizzato in cicli di 21 giorni, di cui 14 giorni di assunzione e 7 giorni di pausa. Il paziente è tenuto a registrare quotidianamente il numero di compresse assunte, suddivise per dosaggio che può essere di 150 mg e/o 500 mg, l'orario di somministrazione e ogni eventuale discrepanza rispetto alla prescrizione, quali dimenticanze, errori di dosaggio o episodi di vomito immediatamente successivi all'assunzione. Il diario deve essere riconsegnato alla visita successiva insieme ai blister, consentendo al clinico di verificare l'aderenza e di correlare eventuali tossicità o variazioni di risposta al corretto utilizzo del farmaco.

Nel loro complesso, questi strumenti permettono di affiancare alla valutazione oggettiva degli esiti clinici una dimensione soggettiva e funzionale, fondamentale in un contesto di medicina personalizzata, dove la decisione terapeutica non si basa esclusivamente sulla biologia molecolare della malattia, ma anche sull'impatto globale del trattamento sulla vita del paziente.

3.7 Valutazione della sicurezza

La sicurezza è valutata in tutti i pazienti che hanno ricevuto almeno una somministrazione del trattamento previsto dal protocollo. Gli eventi avversi (AE) sono raccolti dalla firma del consenso informato fino al termine del follow-up e classificati secondo i Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE), versione 5.0 del National Cancer Institute (NCI).

Un AE è definito come qualsiasi segno, sintomo, alterazione laboratoristica o condizione clinica indesiderata insorta o peggiorata dopo l'inizio del trattamento, indipendentemente dal nesso di causalità con i farmaci in studio.

Una reazione avversa da farmaco (ADR) è un evento per il quale esiste almeno una ragionevole possibilità di relazione causale con il trattamento.

Un evento avverso grave (SAE) è un evento che comporta morte, pericolo di vita, ospedalizzazione o suo prolungamento, disabilità persistente o significativa, anomalia congenita oppure un evento clinicamente rilevante che richieda intervento medico per prevenire tali condizioni.

La gravità degli eventi è stata graduata secondo CTCAE v5.0. Per ciascun AE/SAE lo sperimentatore ha valutato la relazione con il trattamento (non correlato, improbabile, possibile, probabile, sicuramente correlato, non valutabile), registrando tale valutazione nella Case Report Form (CRF).

Per ogni evento sono stati documentati:

- data di insorgenza e risoluzione,
- grado di severità,
- relazione con il trattamento,
- azioni intraprese con i farmaci oggetto di studio (riduzione dose, sospensione, interruzione),
- eventuali terapie concomitanti assunte.

Gli eventi non gravi sono stati seguiti fino a risoluzione o stabilizzazione. Gli eventi avversi gravi sono stati segnalati dal PI o dal personale delegato entro 24 ore allo sponsor secondo le procedure di Good Clinical Practice (GCP) e monitorati fino a completa risoluzione o stabilizzazione. Eventuali SAE correlati sono stati ulteriormente valutati per identificare possibili reazioni avverse gravi inattese (SUSAR).

I dati di sicurezza sono stati analizzati mediante tabelle di frequenza, considerando distribuzione per grado di tossicità e relazione con il trattamento.

4. RISULTATI

Lo studio Sagittarius è stato attivato presso la S.C. di Oncologia dell’Ospedale di Biella a settembre 2024. Da allora sono stati valutati 67 pazienti affetti da carcinoma del colon, di cui 49 sono risultati screening failures e i restanti 18 sono stati arruolati secondo i criteri di eleggibilità (*Figura 16*).

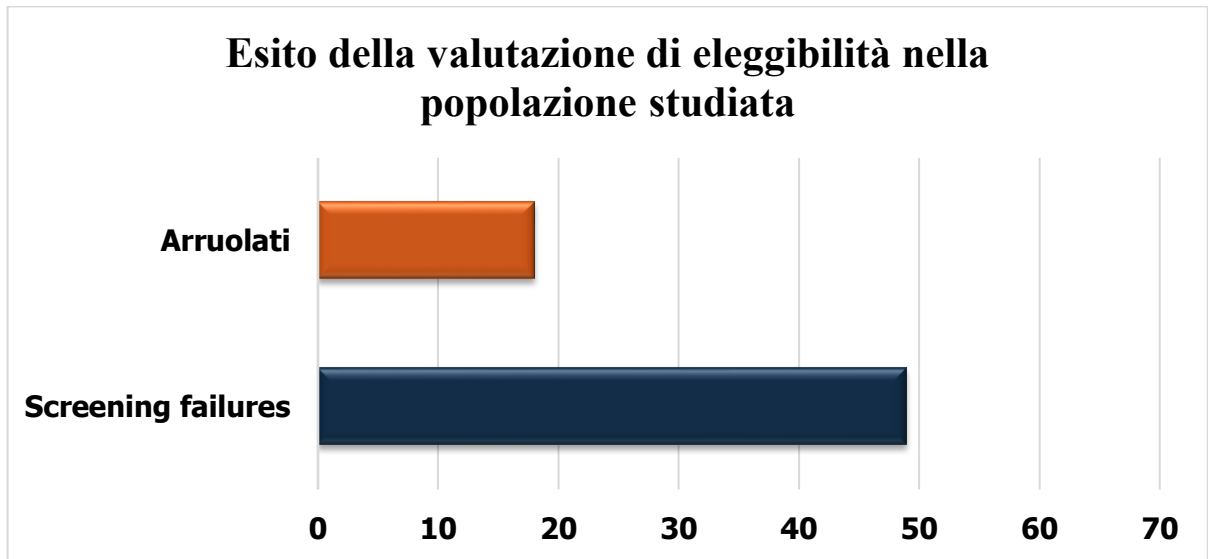


Figura 16. Distribuzione dei pazienti arruolati e degli screening failures nella popolazione analizzata.

Sulla popolazione arruolata è stata quindi effettuata un’analisi descrittiva delle principali caratteristiche demografiche e clinico-patologiche. I dati sono riassunti nella *Tabella 3*.

Caratteristica	Valore
Età	69,9 ± 9,6 anni
Sesso	F 47% – M 53%
Resezione chirurgica	Colon sinistro 24% – Colon destra 76%
Eziologia	Sporadici 94% – Familiari 6%

Tabella 3. Caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione arruolata nello studio (N = 16)

4.1 Screening failures

I motivi per i quali i 49 pazienti non sono rientrati nello studio sono riportati nella *Tabella 4*:

Categoria	N°pazienti	Motivazione
Stadio	15	• Stadio I • Stadio IV • Metastatico
Età	5	• 87-90*
Localizzazione	6	• Distanza del tumore dalla rima anale < 12 cm • Tumore del retto
Comorbidità rilevanti	8	• Cardiopatia • Ischemia cerebrale • Positività al virus dell'HIV
Presentazione clinica acuta	4	• Intervento in urgenza per perforazione • Occlusione intestinale • Decesso post-operatorio
Caratteristiche tumorali	9	• Polipo canceroso • Tumore in situ • Doppio tumore
Rifiuto	2	• Paziente non accetta di partecipare
Altro	1	• Portatore di PM

Tabella 4. Distribuzione delle cause di esclusione dei pazienti durante la valutazione dei criteri di eleggibilità. Per ciascuna categoria sono riportati il numero di pazienti esclusi e le principali motivazioni cliniche.

**L'età non è tra i criteri di esclusione dello studio, ma il clinico non ha ritenuto di poter rischiare che pazienti di questa età affrontassero una CT*

4.2 Stadiazione

I referti istologici dei campioni prelevati, durante la resezione chirurgica del tumore dei pazienti arruolati, sono stati prodotti dall'Anatomia Patologica dell'Ospedale degli Infermi di Biella, secondo sistema TNM dell'AJCC/UICC 8^a edizione (*Tabella 5*):

Paziente	TNM	Grado	Stadiazione
1	pT3 pN2a	G2	Stadio III-HR*
2	pT3 pN1a	G2	Stadio III
3	pT4b pN1b	G2	Stadio III-HR*
4	pT3 pN2a	G3	Stadio III-HR*
5	pT3 pN2a	G3	Stadio III-HR*
6	pT3 pN0	G3	Stadio II-HR
7	pT3 pN0	G3	Stadio II-HR
8	pT3 pN0	G3	Stadio II-HR
9	pT4b pN0	G2	Stadio II-HR
10	pT3 pN0	G2	Stadio II-HR
11	pT3 pN1b	G2	Stadio III
12	pT3 pN0	G3	Stadio II-HR
13	pT3 pN0	G3	Stadio II-HR
14	pT3 pN0	G2	Stadio II-HR
15	pT3 pN1b	G2	Stadio III

16	pT1 pN2a	G2	Stadio III
17	pT4 pN1a	G2	Stadio III-HR*
18	pT3 pN1b	G2	Stadio III

*HR= alto rischio

Tabella 5. Caratteristiche clinico-patologiche della popolazione studiata. Per ciascun paziente sono riportati la classificazione patologica TNM, il grado istologico del tumore e la stadiazione secondo i criteri AIOM

In Figura 17 è riportata la percentuale delle varie stadiazioni nella popolazione campione.

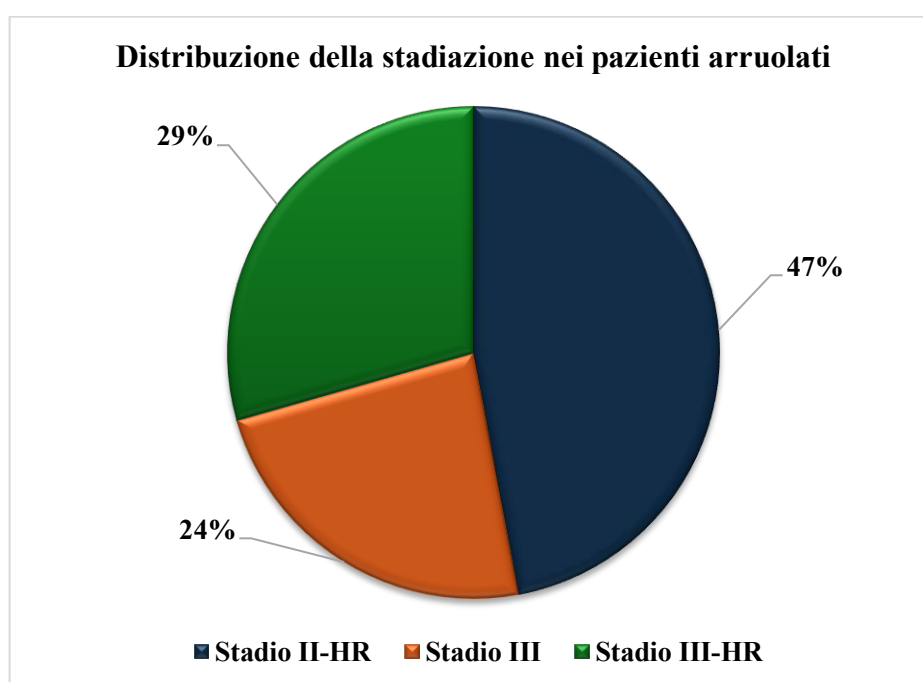


Figura 17. Rappresentazione percentuale della stadiazione patologica dei pazienti arruolati nello studio, suddivisi in stadio II ad alto rischio (II-HR), stadio III e stadio III ad alto rischio (III-HR)

Le prossime analisi escluderanno i pazienti 17 e 18 in quanto appena arruolati, in attesa del referto della biopsia liquida.

4.3 Andamento longitudinale della biopsia liquida

Nel Figura 18 verrà mostrata la proporzione dei pazienti classificati come stadio II ad alto rischio (II-HR), stadio III e stadio III ad alto rischio (III-HR) rispettivamente nel Trial-1 (*Figura 18A*) e nel Trial-2 (*Figura 18B*), espressa in percentuale.

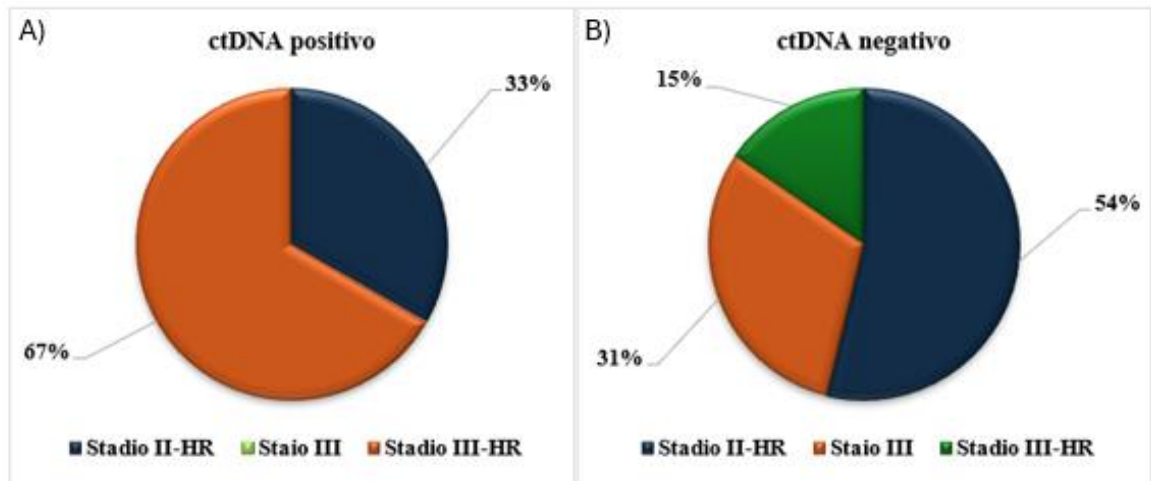


Figura 18. Distribuzione degli stadi patologici nei pazienti inclusi nei due bracci dello studio

Nella *Tabella 6* sono rappresentati tutti gli esiti dei ctDNA dei pazienti arruolati, prelevati secondo i rispettivi time-points da studio:

- Trial-1
 - Solo al baseline per i pazienti trattati con terapia convenzionale
 - A 3 e 6 mesi per i pazienti trattati con terapia personalizzata
- Trial-2
 - Solo al baseline per i pazienti trattati con terapia scelta dal medico
 - A 2 e 4 mesi per i pazienti in intensive FU/ CAPE

Paziente	Baseline	I LB	II LB
1	Negativa	Positiva	-
2	Negativa	-	-
3	Negativa	Negativa	Negativa
4	Positiva	-	-
5	Negativa	Negativa	Negativa
6	Negativa	Negativa	Negativa
7	Negativa	Negativa	Negativa
8	Negativa	-	-
9	Negativa	-	-
10	Negativa	Negativa	-
11	Negativa	-	-
12	Positiva	-	-
13	Negativa	Negativa	Negativa
14	Negativa	-	-
15	Negativa	Negativa	Negativa
16	Negativa	-	-

Tabella 6. Andamento longitudinale dello stato del ctDNA nei pazienti arruolati durante le diverse fasi dello studio, con indicazione dei risultati della biopsia liquida al baseline, al primo e al secondo prelievo

Ne consegue, la distribuzione riportata nella *Figura 19*.

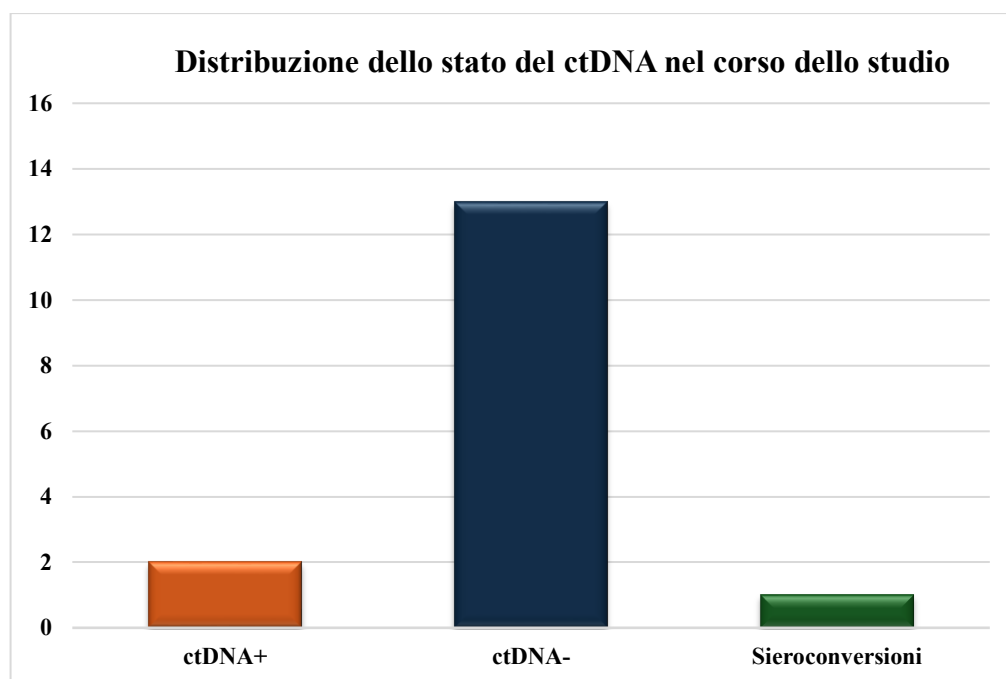


Figura 19. Distribuzione dello stato del ctDNA nel corso dello studio. Sull'asse delle ordinate è riportato il numero di pazienti, mentre sull'asse delle ascisse sono indicate le categorie ctDNA+, ctDNA- e sieroconversione

I ctDNA positivi rientrano nel Trial-1, mentre i ctDNA negativi nel Trial-2.

4.4 Popolazione del Trial-1

Dai referti di profilazione genomica tumorale completa (NGS), eseguiti con Illumina TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) presso Cogentech, sono emerse le seguenti mutazioni per ogni paziente del Trial-1 (*Tabella 7*).

Paziente	KRAS	Profilo MSI	TMB	Alterazioni aggiuntive
1	WT	MSS	9,4	APC, TP53
4	G12S	MSS	11,8	APC, FBXW7, PTEN
12	G12A	MSS	5,5	APC, TP53

Tabella 7. Caratteristiche molecolari dei pazienti ctDNA positivi analizzati mediante sequenziamento genomico

In seguito alla randomizzazione, i pazienti sono stati assegnati ai diversi trattamenti previsti dal protocollo di studio, come riportato nella *Tabella 8*.

Paziente	Braccio di stratificazione	Terapia
1	STRATA 2	FOLFOX
4	STRATA 1	FOLFOX
12	STRATA 1	XELOX

Tabella 8. Stratificazione dei pazienti ctDNA positivi nei bracci dello studio e schemi di trattamento chemioterapico adiuvante correlati

4.5 Popolazione del Trial-2

I risultati ottenuti su ciascun paziente del Trial-2, in merito alla profilazione genomica tumorale completa (NGS), eseguita con Illumina TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) presso Cogentech, sono i seguenti (*Tabella 9*):

Pazienti	KRAS	BRAF	Profilo MSI	TMB	Alterazioni aggiuntive
2	G13D	-	MSS	8,6	• APC • TP53
3	G12D	-	MSS	6,3	• CTNNB1
5	A146T	-	MSI-H	41,4	• MSH6 • MET • APC • PIK3CA • TP53
6	G12D + G13D	-	MSI-H	57,7	• MLH1 • ARID1A • APC • PIK3CDA • NBN

7	G12C	-	MSS	7,1	• CTNNB1 • TP53
8	G13D	-	MSS	5,5	• APC • ARID1A
9	G12D	-	MSS	5,5	• APC • ATM • PIK3CA
10	G12D	-	MSS	3,9	• APC • PIK3CA • SMAD4
11	G12S + G12V	-	MSS	11,7	• APC • PIK3CA
13	-	V600E	MSI-H	34,5	• ARID1A • RNF43
14	-	-	MSS	11,8	• APC • TP53
15	-	-	MSS	9,4	• APC • PIK3CA • TP53
16	G12V	-	MSS	8,6	• APC • AKT1

Tabella 9. Profilo molecolare ottenuto mediante sequenziamento genomico, con indicazione dello stato mutazionale dei geni KRAS e BRAF, del profilo di instabilità dei microsatelliti (MSI), del tumor mutational burden (TMB) e delle principali alterazioni genetiche aggiuntive identificate.

In accordo con il protocollo di studio, i pazienti sono stati randomizzati a una strategia basata su follow-up intensivo o su capecitabina se lo stadio era III-HR oppure a un approccio terapeutico scelto del medico. Le terapie assegnate sono state: CAPE, CAPOX E 5-FU (*Tabella 10*).

Pazienti	Trattamento				
	Physician Choice			Intensive FU	CAPE*
	CAPE	CAPOX	5-FU		
2	-	X	-	-	-
3	-	-	-	-	X
5	-	-	-	X	-
6	-	-	-	X	-
7	-	-	-	X	-
8	X	-	-	-	-
9	-	X	-	-	-
10	-	-	-	X	-
11	-	X	-	-	-
13	-	-	-	X	-
14	X	-	-	-	-
15	-	-	-	X	-
16	-	-	X	-	-

Tabella 10. Assegnazione ai diversi regimi terapeutici in seguito alla randomizzazione. Sono riportati i trattamenti scelti nei diversi bracci dello studio: Physician Choice (CAPE, CAPOX o 5-FU), Intensive FU e CAPE solo per pazienti stadio III-HR*

4.6 Eventi avversi relati a terapia

Gli eventi avversi sperimentati dai pazienti sono stati analizzati in base al trattamento effettuato: FOLFOX, CAPE, CAPOX, 5-FU. La paziente 16, l'unica trattata con 5-FU, ha mostrato anemia e debolezza muscolare.

Nel seguente grafico sono stati riportati gli AE dei pazienti 1, 3, 8, 14 trattati con capecitabina. La paziente 1 è stata trattata nel Trial-2 solo per 4 cicli, prima di essere riassegnata al Trial-1 per sieroconversione, pertanto i suoi AE sono riferiti solo a quel periodo (*Figura 20*).

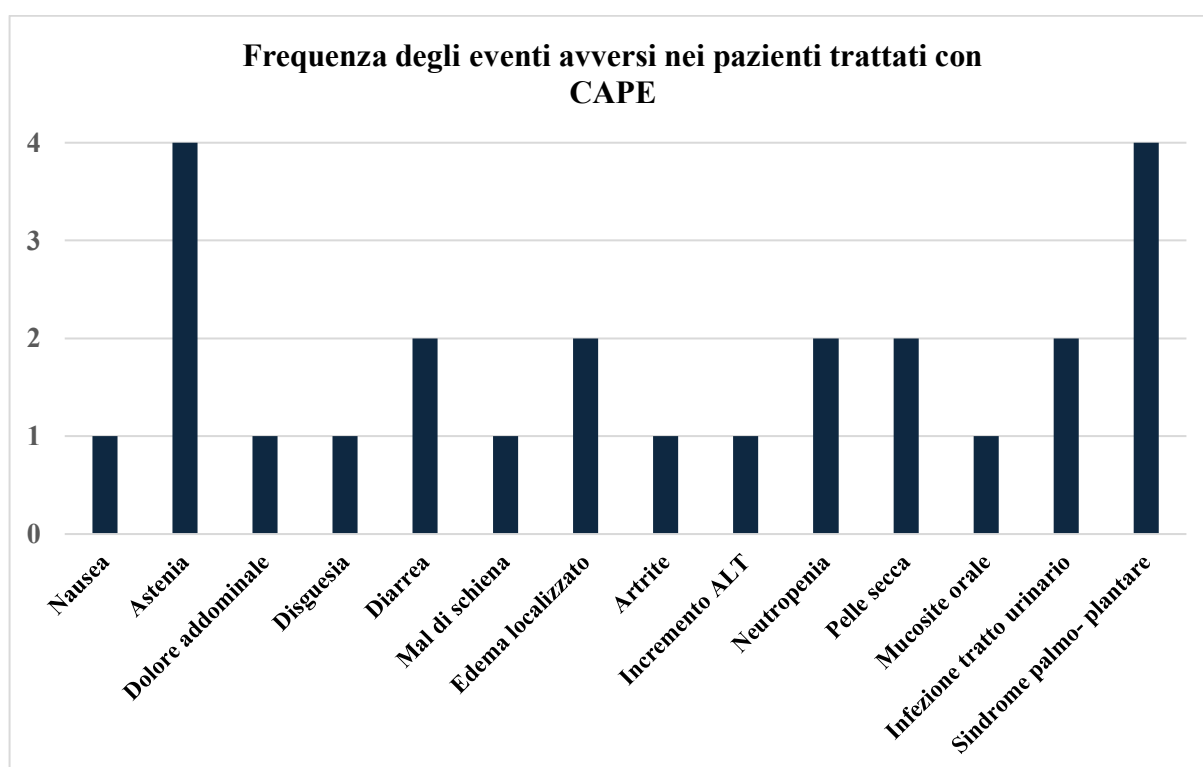


Figura 20. Frequenza dei principali eventi avversi osservati nei pazienti trattati con capecitabina

I pazienti 2, 9, 11 e 12 sono stati trattati con CAPOX e hanno mostrato i seguenti AE (*Figura 21*).

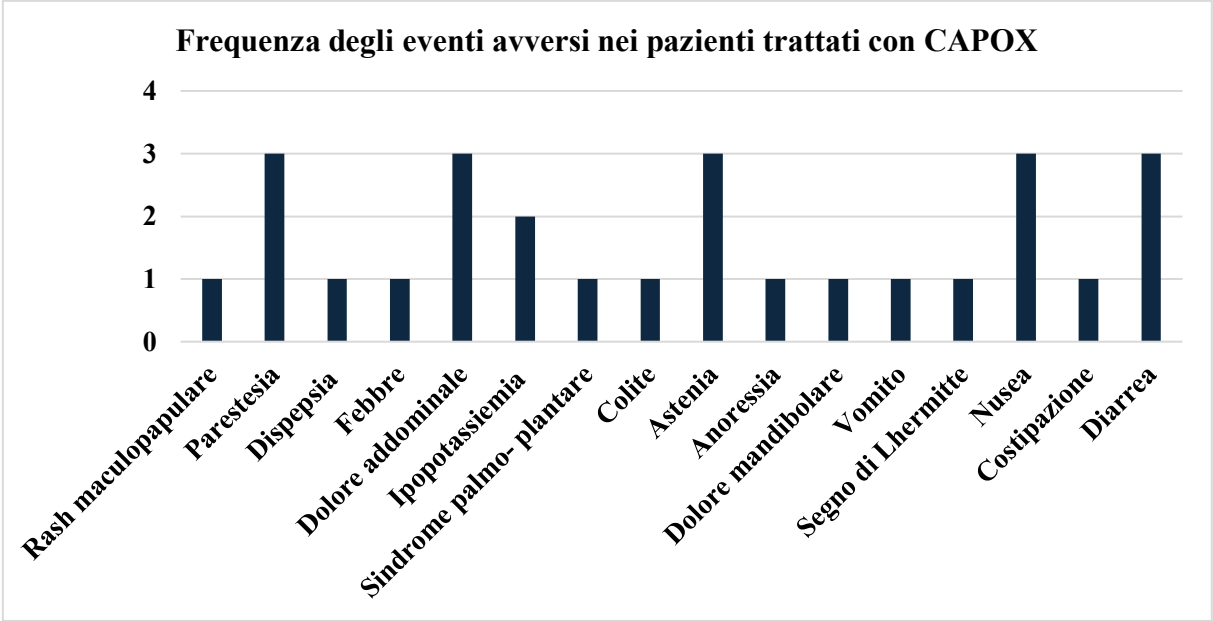


Figura 21. Frequenza dei principali eventi avversi osservati nei pazienti trattati con schema CAPOX

Solo i pazienti 1 e 4 sono stati trattati con FOLFOX, in particolare il paziente 1, solo dopo riassegnazione (*Figura 22*).



Figura 22. Frequenza degli eventi avversi nei pazienti trattati con schema FOLFOX nel Trial-1

4.7 Caso di evento avverso serio (SAE)

Una paziente di 62 anni, sottoposta a intervento chirurgico di emicolectomia destra robotica, dopo aver accettato di entrare nello studio firmando il consenso informato, risulta negativa al test per ctDNA (LB-A). In seguito alla randomizzazione prevista dal protocollo, viene assegnata al braccio *Physician Choice* e assegnata al trattamento adiuvante con schema CAPOX.

Il primo ciclo di terapia è stato tuttavia eseguito esclusivamente con capecitabina, a causa di problematiche legate al posizionamento del catetere venoso centrale (CVC). Dopo il secondo ciclo chemioterapico, nonché primo ciclo completo secondo lo schema previsto, a base di CAPOX (capecitabina in associazione con oxaliplatino), in data 29/08/2026 la paziente ha sviluppato febbre, dolore addominale e diarrea di grado G3–G4, associati a tossicità cutanea di grado G2, rendendo necessario il ricovero presso il reparto di Oncologia. All'ingresso è stata impostata terapia di supporto con reintegrazione idro-elettrolitica per via endovenosa, nutrizione parenterale e terapia antibiotica con ceftriaxone. Nel corso della degenza di 25 giorni, è stato osservato un progressivo miglioramento sia del quadro clinico sia dei parametri laboratoristici.

Considerata la tossicità significativa insorta durante il trattamento, è stato concordato con la paziente l'interruzione della terapia adiuvante e la prosecuzione del percorso di follow-up. La paziente continua, pertanto, a eseguire tutte le procedure previste dal protocollo di studio: controlli clinici, compilazione dei questionari e raccolta di PBMC con cadenza trimestrale per i primi cinque anni, mentre colonscopia, dosaggio del CEA e TC vengono effettuati secondo le tempistiche previste da pratica clinica.

4.8 Caso di reazione avversa da infusione

Una paziente di 78 anni dopo resezione chirurgica e firma del consenso informato, risulta positiva al ctDNA (LB-A). In considerazione del profilo mutazionale viene inserita nel Trial-1, Strata 1, e dopo randomizzazione assegnata al braccio sperimentale, che prevede trattamento iniziale con schema CAPOX per una durata di tre mesi.

Al termine della prima infusione di oxaliplatino, la paziente riferisce comparsa di dispnea associata a sensazione di costrizione a livello del collo e disfonia. Viene prontamente trattata con Flebocortid 500 mg e successivamente con Trimeton endovena, con iniziale miglioramento

della sintomatologia. Il giorno seguente, dopo l'assunzione di capecitabina, manifesta nausea e vomito non responsivi a Plasil.

Alla luce della tossicità gastrointestinale e soprattutto del laringospasmo riportati già dopo il primo ciclo di terapia, il trattamento con XELOX viene sospeso. Si decide pertanto di proporre un nuovo schema terapeutico, FUFA secondo de Gramont, a dosaggio ridotto.

Come previsto dal protocollo di studio, l'avvio di un nuovo trattamento comporta l'uscita della paziente dallo studio.

4.9 Caso di sieroconversione e recidiva

Una paziente di 59 anni sottoposta a resezione chirurgica, dopo adeguata acquisizione del consenso informato ed esito di biopsia liquida negativa (LB-A), rientra nel Trial-2 e viene randomizzata nel braccio di follow-up intensivo (Intensive FU), con avvio di terapia adiuvante con capecitabina (stadio III-HR) per una durata complessiva di sei mesi.

Come previsto dal protocollo, i pazienti caduti nel braccio di FU intensivo/ capecitabina vengono sottoposti al secondo mese ad un ulteriore prelievo ematico per la rivalutazione del ctDNA (LB-D). La paziente risulta positiva a questa valutazione e si procede pertanto a riassegnarla nel Trial-1, con successiva randomizzazione nel braccio standard e inizio di trattamento con schema FOLFOX.

Nel periodo compreso tra il 18/02/2025 e il 05/08/2025 la paziente completa 12 cicli di terapia, ma l'ultimo viene somministrato in assenza di oxaliplatino a causa della comparsa di neurotossicità periferica.

Nonostante l'assenza di reperti patologici alla TC e livelli di CEA nei limiti di norma, alla colonscopia di controllo, eseguita a un anno dall'intervento chirurgico, come previsto dal protocollo, è stata evidenziata una sospetta recidiva anastomotica, con conseguente prelievo biptico. La diagnosi viene confermata dall'esame istologico, che documenta frammenti di adenocarcinoma associati a lembi di mucosa del grosso intestino, e la paziente viene quindi rioperata per rimozione della lesione, uscendo dallo studio, ma continuando ad essere monitorata con FUP quadrimestrali per pratica clinica.

Questo caso costituisce l'unico episodio di recidiva riscontrato nella popolazione studiata.

5. DISCUSSIONE

Il primo elemento emerso dall'analisi dei risultati riguarda il processo di selezione dei pazienti candidati allo studio Sagittarius presso la S.C. Oncologia dell'Ospedale degli Infermi di Biella. Durante il periodo di osservazione sono stati valutati complessivamente 67 pazienti, dei quali 18 sono risultati eleggibili e sono stati arruolati nello studio, mentre 49 pazienti (73%) sono stati classificati come screening failures.

L'analisi delle cause di esclusione evidenzia come i motivi principali siano riconducibili a criteri clinici, anatomopatologici non compatibili con l'inclusione nello studio. In particolare, la categoria più rappresentata (15 pazienti) è risultata quella dello stadio di malattia non corrispondente a quello previsto per la popolazione arruolabile. Un'ulteriore quota rilevante di esclusioni è stata determinata dalle caratteristiche tumorali non corrispondenti a quelle previste nei criteri di inclusione osservate in 9 pazienti, comprendenti ad esempio polipi cancerosi, tumori in situ o localizzazioni tumorali non compatibili. Altri fattori che hanno contribuito all'esclusione sono stati rappresentati dalla presenza di comorbidità clinicamente rilevanti (8 pazienti), dall'età non compatibile con la somministrazione di CT (5 pazienti) e dalla presentazione clinica acuta della malattia, come nei casi di perforazione o occlusione intestinale che hanno richiesto un intervento chirurgico urgente (4 pazienti). Infine, un numero limitato di pazienti è stato escluso per rifiuto alla partecipazione o per altre condizioni cliniche particolari.

Nel complesso, questi dati evidenziano come meno di un terzo dei pazienti, inizialmente valutati, sia risultato effettivamente arruolabile nello studio. Questo dato riflette la necessità, nei protocolli di medicina di precisione, di selezionare una popolazione relativamente omogenea dal punto di vista clinico e biologico, al fine di valutare in maniera accurata il ruolo di biomarcatori molecolari come il ctDNA nella stratificazione prognostica e nella definizione delle strategie terapeutiche [87].

Dal punto di vista metodologico, la percentuale di screening failures osservata nel centro di Biella appare coerente con quanto riportato nella letteratura relativa agli studi prospettici che impiegano biomarcatori molecolari per la selezione di pazienti affetti da carcinoma del colon. In particolare, diversi trial clinici che valutano strategie terapeutiche guidate dal ctDNA hanno evidenziato come la fase di screening rappresenti spesso una delle principali limitazioni operative [69].

Nel trial DYNAMIC, ad esempio, che ha valutato l'utilizzo del ctDNA per guidare la terapia adiuvante nei pazienti con carcinoma del colon in stadio II, una quota significativa di pazienti

inizialmente valutati non è risultata eleggibile per motivi clinici, tra cui caratteristiche tumorali non compatibili o impossibilità di effettuare correttamente le analisi molecolari previste dal protocollo [63]. Analogamente, altri studi come CIRCULATE-Japan e GALAXY hanno riportato percentuali di esclusione non trascurabili, legate alla necessità di rispettare criteri di inclusione molto stringenti per garantire l'accuratezza delle analisi biologiche e dei risultati clinici [74].

L'analisi delle caratteristiche demografiche e clinico-patologiche della popolazione arruolata presso il centro di Biella evidenzia una coorte complessivamente rappresentativa della popolazione affetta da carcinoma del colon in fase iniziale. L'età media dei pazienti inclusi nello studio è risultata pari a $69,9 \pm 9,6$ anni, valore in linea con i dati epidemiologici che indicano come il carcinoma del colon colpisca prevalentemente soggetti in età avanzata, con un picco di incidenza tra la sesta e la settima decade di vita [88].

Per quanto riguarda la distribuzione per sesso, nella coorte analizzata si osserva una lieve predominanza maschile, con il 53% di pazienti di sesso maschile rispetto al 47% di sesso femminile. Anche questo dato appare coerente con le principali analisi epidemiologiche internazionali, che riportano un'incidenza leggermente più elevata del carcinoma del colon negli uomini rispetto alle donne.

Dal punto di vista eziologico, la grande maggioranza dei pazienti inclusi nello studio presentava una forma sporadica di carcinoma del colon (94%), mentre solo una piccola quota di casi risultava associata a una possibile familiarità (6%). Questo dato rispecchia quanto riportato nella letteratura scientifica, secondo cui circa il 70–80% dei carcinomi del colon ha origine sporadica, mentre una percentuale più ridotta è correlata a predisposizioni ereditarie o sindromi genetiche specifiche [89].

Un ulteriore elemento analizzato riguarda la sede della resezione chirurgica. Nella popolazione studiata si osserva una prevalenza di tumori localizzati nel colon destro (76%) rispetto al colon sinistro (24%).

Per quanto riguarda la stadiazione patologica, la popolazione arruolata comprende principalmente pazienti appartenenti a categorie di rischio intermedio o elevato, come previsto dal disegno dello studio. In particolare, la distribuzione percentuale evidenzia una predominanza di pazienti classificati come stadio II ad alto rischio, seguiti da pazienti in stadio III e da pazienti in stadio III ad alto rischio. Questa distribuzione appare coerente con il

razionale dello studio Sagittarius, che si propone di valutare il ruolo della MRD proprio nelle categorie di pazienti in cui il beneficio della terapia adiuvante risulta più incerto [87].

In questo contesto, numerosi studi recenti hanno dimostrato che la presenza di ctDNA rilevabile nel sangue dopo resezione chirurgica rappresenta uno dei più potenti fattori prognostici di recidiva nel carcinoma coloretale. In particolare, il trial prospettico GALAXY ha evidenziato che i pazienti con ctDNA positivo dopo chirurgia presentano un rischio di recidiva significativamente più elevato rispetto ai pazienti ctDNA negativi, indipendentemente dalla stadiazione patologica tradizionale del tumore primitivo [74].

Analogamente, lo studio DYNAMIC ha dimostrato che l'utilizzo del ctDNA per guidare la decisione sulla terapia adiuvante, nei pazienti con carcinoma del colon in stadio II, consente di ridurre significativamente il numero di pazienti trattati con chemioterapia senza compromettere la sopravvivenza libera da recidiva. Questi risultati suggeriscono che la stratificazione del rischio basata su biomarcatori molecolari potrebbe affiancare o integrare la stadiazione patologica tradizionale [63].

Nel presente studio, l'analisi dello stato del ctDNA ha rappresentato il fulcro del disegno sperimentale, poiché la distribuzione dei pazienti nei diversi bracci dello studio è stata determinata proprio sulla base dei risultati della biopsia liquida eseguita al baseline.

I dati ottenuti presso il centro di Biella mostrano una netta predominanza di pazienti ctDNA negativi 83%, mentre solo una minoranza è risultata positiva 17%. Questo risultato appare coerente con quanto osservato nella letteratura scientifica, dove la maggior parte dei pazienti sottoposti a resezione chirurgica con intento curativo risulta negativa al ctDNA, suggerendo una probabile assenza di MRD [72].

Tra i pazienti ctDNA positivi è stata inoltre eseguita una profilazione genomica completa mediante NGS che ha permesso di analizzare lo stato mutazionale di diversi geni chiave coinvolti nella carcinogenesi coloretale, tra cui KRAS, APC, TP53 e PIK3CA, oltre alla valutazione dello stato dei microsatelliti e del TMB.

I risultati ottenuti mostrano una prevalenza di tumori con profilo MSS e valori di TMB relativamente bassi, caratteristiche tipiche della maggior parte dei carcinomi del colon sporadici [90]. Per quanto riguarda il gene KRAS, sono state identificate diverse mutazioni puntiformi, tra cui G12D e G12A, che rappresentano tra le alterazioni più frequentemente osservate nel carcinoma del colon [91]. Mutazioni in questo gene sono presenti in circa il 40% dei tumori del

colon e determinano l'attivazione costitutiva della via di segnalazione RAS-MAPK, contribuendo alla proliferazione e alla sopravvivenza delle cellule tumorali.

Tra le altre alterazioni genetiche osservate figurano mutazioni nei geni APC, TP53, PIK3CA, ARID1A e CTNNB1, tutti coinvolti nei principali pathway molecolari della carcinogenesi del colon. In particolare, le mutazioni del gene APC rappresentano uno degli eventi molecolari più precoci nello sviluppo del carcinoma del colon, mentre le alterazioni di TP53 sono generalmente associate alle fasi più avanzate della progressione tumorale.

Per quanto riguarda la sicurezza dei trattamenti adiuvanti, gli eventi avversi osservati nella coorte analizzata risultano complessivamente in linea con i profili di tossicità già descritti nella letteratura per i principali regimi chemioterapici utilizzati nel carcinoma del colon. I regimi contenenti oxaliplatino, come CAPOX e FOLFOX, sono noti per essere associati alla comparsa di neuropatia periferica sensoriale, mentre i trattamenti basati su fluoropirimidine, come CAPE e 5-FU, sono più frequentemente associati a sindrome palmo-plantare e astenia (*Figura 20*) [45,11].

Nel complesso, gli eventi avversi osservati nella popolazione analizzata non introducono elementi discordanti rispetto ai dati della letteratura, ma rappresentano piuttosto una conferma del profilo di sicurezza già noto dei regimi adiuvanti standard.

Particolarmente interessante, dal punto di vista scientifico, è il caso di sieroconversione del ctDNA associata a successiva recidiva. Questo episodio appare fortemente in linea con le evidenze più recenti sulla malattia residua molecolare. Studi prospettici hanno infatti dimostrato che la comparsa di ctDNA durante il periodo di trattamento rappresenta uno dei più potenti indicatori precoci di recidiva nel carcinoma del colon, spesso anticipando la diagnosi radiologica di diversi mesi [71,72].

Nel complesso, quindi, i dati osservati nella coorte del centro di Biella non evidenziano risultati in contrasto con la letteratura scientifica, ma forniscono piuttosto una conferma in un contesto di pratica clinica reale di due aspetti centrali: da un lato il profilo di tossicità dei regimi adiuvanti standard, dall'altro il significativo valore prognostico del ctDNA nel monitoraggio della malattia residua molecolare.

6. CONCLUSIONE

Il presente lavoro di tesi ha analizzato l'applicazione della biopsia liquida e della profilazione genomica tumorale nel contesto dello studio clinico Sagittarius, con particolare riferimento all'esperienza maturata presso il reparto S.C. Oncologia dell'Ospedale degli Infermi di Biella. L'obiettivo principale è stato valutare il potenziale della rilevazione del ctDNA come biomarcatore di MRD nei pazienti affetti da carcinoma del colon in stadio II ad alto rischio e stadio III sottoposti a resezione chirurgica.

Nel complesso, i dati ottenuti risultano coerenti con il razionale biologico e clinico dello studio Sagittarius. Le caratteristiche cliniche della popolazione arruolata, tra cui l'età media, la distribuzione per sesso e la prevalenza di forme sporadiche di carcinoma coloretale, risultano infatti sovrapponibili a quelle generalmente descritte nella letteratura epidemiologica per questa patologia. Analogamente, la distribuzione degli stadi patologici e dei fattori di rischio riflette una popolazione clinicamente appropriata per la valutazione del ruolo del ctDNA nella stratificazione prognostica.

L'analisi dello stato del ctDNA ha rappresentato il fulcro dell'approccio sperimentale adottato nello studio. Nella coorte analizzata è stata osservata una prevalenza di pazienti ctDNA negativi dopo resezione chirurgica, risultato coerente con quanto riportato negli studi prospettici internazionali, nei quali la maggior parte dei pazienti operati con intento curativo non presenta evidenza di MRD immediatamente dopo l'intervento. Tuttavia, l'osservazione di casi di positività del ctDNA e di sieroconversione sottolinea il potenziale del monitoraggio molecolare nel rilevare precocemente la persistenza o la ricomparsa di cloni tumorali residui.

Particolarmente significativo è il caso di sieroconversione associato a successiva recidiva osservato nella popolazione studiata. Questo episodio conferma il valore prognostico del ctDNA come biomarcatore dinamico di MRD e appare coerente con quanto descritto in diversi studi prospettici, nei quali la positività del ctDNA precede la diagnosi radiologica di recidiva di diversi mesi.

Dal punto di vista molecolare, la profilazione genomica dei tumori ha evidenziato alterazioni genetiche tipiche del carcinoma del colon sporadico, tra cui mutazioni nei geni KRAS, APC e TP53, oltre a una predominanza di tumori con profilo MSS e TMB relativamente basso. Questi risultati riflettono il panorama molecolare generalmente osservato nei carcinomi del colon sporadici e confermano il ruolo della caratterizzazione genomica nella comprensione della biologia tumorale e nella definizione di eventuali strategie terapeutiche mirate.

L'analisi degli eventi avversi associati ai trattamenti adiuvanti ha mostrato un profilo di tossicità complessivamente in linea con quanto descritto nella letteratura per i regimi chemioterapici contenenti fluoropirimidine e oxaliplatino. In particolare, la comparsa di tossicità gastrointestinali e neuropatie periferiche rappresenta un effetto collaterale atteso dei regimi standard e costituisce uno dei principali limiti della chemioterapia adiuvante convenzionale. In questo contesto, la possibilità di identificare attraverso il ctDNA i pazienti realmente a rischio di recidiva assume particolare rilevanza, poiché potrebbe consentire di ridurre l'esposizione a trattamenti potenzialmente tossici nei soggetti con basso rischio biologico.

Nel complesso, i risultati osservati nella coorte del centro di Biella non evidenziano discrepanze rispetto alla letteratura scientifica disponibile, ma rappresentano piuttosto una conferma, in un contesto di pratica clinica reale, del valore prognostico del ctDNA come indicatore di malattia residua molecolare. L'esperienza maturata nell'ambito dello studio Sagittarius dimostra inoltre la fattibilità dell'integrazione tra profilazione genomica tumorale, biopsia liquida e ricerca clinica nel percorso di gestione dei pazienti con carcinoma del colon operabile.

Lo studio Sagittarius si inserisce infatti in un contesto di crescente evoluzione verso la medicina di precisione, con l'obiettivo di superare l'approccio terapeutico tradizionale basato esclusivamente sulla stadiazione anatomopatologica. Attraverso l'integrazione tra genomica tumorale e monitoraggio dinamico del ctDNA, questo modello mira a identificare precocemente i pazienti con MRD e a guidare strategie terapeutiche più mirate, riducendo al contempo il rischio di sovratrattamento nei pazienti biologicamente a basso rischio.

Sebbene i dati analizzati in questo lavoro derivino da una coorte numericamente limitata e non consentano di trarre conclusioni definitive sugli endpoint clinici dello studio, i risultati ottenuti risultano coerenti con gli obiettivi del protocollo Sagittarius e con il crescente corpus di evidenze scientifiche a supporto dell'utilizzo del ctDNA nel carcinoma del colon.

In prospettiva futura, l'integrazione della biopsia liquida nella pratica clinica potrebbe contribuire a ridefinire la gestione dei pazienti con carcinoma del colon operabile, consentendo una stratificazione prognostica più accurata e una personalizzazione delle strategie terapeutiche. In questo scenario, il ctDNA si configura come uno dei biomarcatori più promettenti per guidare le decisioni cliniche, con il potenziale di migliorare gli esiti terapeutici e ridurre l'esposizione a trattamenti non necessari.

Se i risultati dello studio Sagittarius confermeranno le aspettative iniziali, questo approccio potrebbe rappresentare un passo significativo verso una oncologia sempre più personalizzata,

capace di integrare informazioni cliniche, patologiche e genomiche per ottimizzare la gestione terapeutica dei pazienti.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017;66(4):683-91.
- [2] World Health Organization. Cancer fact sheets: colorectal cancer. Geneva: WHO; aggiornamenti vigenti.
- [3] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
- [4] Ferlay J, Ervik M, Lam F, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer (IARC), 2020.
- [5] AIOM, AIRTUM. I numeri del cancro in Italia. Il Pensiero Scientifico Editore, ultima edizione.
- [6] Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM), Associazione Italiana Registri Tumori (AIRTUM). I numeri del cancro in Italia 2024. Roma: AIOM; 2024.
- [7] Bretthauer 2022 (trial contemporaneo sulla colonscopia).
- [8] Burnett-Hartman AN, Lee JK, Demb J, Gupta S. An update on the epidemiology, molecular characterization, diagnosis, and screening strategies for early-onset colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2021;160(4):1041-9.
- [9] International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow. Lyon: IARC; 2022.
- [10] Associazione Italiana Registri Tumori (AIRTUM). Previsioni dell'incidenza dei tumori in Italia. *Epidemiol Prev*. 2022;46(1 Suppl 1):1-120.
- [11] Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM), Associazione Italiana Registri Tumori (AIRTUM). I numeri del cancro in Italia 2024. Roma: AIOM; 2024.
- [12] O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(19):1420-5.
- [13] Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*. 2015;21(11):1350–1356.

- [14] UpToDate: Molecular genetics of colorectal cancer – circa il 70% casi sporadici.
- [15] Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017;66(4):683-91.
- [16] World Cancer Research Fund. Colorectal Cancer Statistics & Prevention Report, updated 2024.
- [17] Schwingshackl L et al. Fruit and vegetable intake and colorectal cancer risk: updated meta analysis. *Int J Cancer*. 2023.
- [18] Jafari Nasab S et al. Red and processed meat consumption and colorectal cancer risk: updated systematic review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol*. 2024.
- [19] Baena R, Salinas P. Diet and colorectal cancer. *Molecules*. 2015; aggiornamento citazioni 2022.
- [20] Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, Islami F, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol*. 2011;22(9):1958-72.
- [21] Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*. 2017;474(11):1823-36.
- [22] Wong SH, Yu J. Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(11):690-704.
- [23] Zhou B, et al. Progressively altered genes in colorectal carcinogenesis: roles of genetic and epigenetic mechanisms. *Sci Rep*. 2025;
- [24] Recapitulating the adenoma–carcinoma sequence: chromosomal instability and stepwise somatic alterations in colorectal cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2024;
- [25] Navarro-Jiménez M, et al. KRAS-targeted therapies in colorectal cancer: a systematic analysis of mutations, inhibitors, and clinical trials. *npj Precis Oncol*. 2025.
- [26] Freckelton J, et al. Clinical and Molecular Profiling of Colorectal Cancer. *Curr Oncol*. 2025.
- [27] Prideaux IC, et al. Correlation of DNA mismatch repair status with clinicopathological features in sporadic colorectal carcinoma: a meta-analysis. *J Clin Pathol*. 2024.

- [28] Overman MJ, Ernstoff MS, et al. Immune checkpoint inhibition in microsatellite instability–high colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2023.
- [29] Sinicrope FA. Lynch syndrome and microsatellite instability in colorectal cancer: molecular mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022.
- [30] Shah SM, et al. Exploring POLE exonuclease driver mutations and mutation burden across cancers. *Cancer Res Commun*. 2024
- [31] Xu T, Zhang X, Zheng D, et al. The clinical landscape of POLE-mutant colorectal cancer: a retrospective analysis of real-world outcome. *BMC Med*. 2026
- [32] Ambrosini M, et al. Immune checkpoint inhibitors for POLE or POLD1-mutant cancers: an overview. *Ann Oncol*. 2024
- [33] Jeong H, et al. Mechanisms of resistance to EGFR blockade in colorectal cancer: beyond RAS/RAF mutations. *Clin Cancer Res*. 2024
- [34] Tosi F, et al. HER2 amplification in metastatic colorectal cancer: biology, diagnostics, and targeted therapies. *Cancers (Basel)*. 2025
- [35] Wang Z, et al. Spatial and temporal dynamics of HER2 signaling in colorectal cancer. *Cell Rep*. 2023
- [36] Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM). Linee guida: tumori del colon-retto. Roma: AIOM; aggiornamento 2024.
- [37] Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, et al. NCCN Guidelines Insights: Colon Cancer, Version 2.2021. *J Natl Compr Canc Netw*. 2021;19(3):329–339.
- [38] Grothey A, Sobrero AF, Shields AF, et al. Duration of Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer (IDEA Collaboration). *N Engl J Med*. 2018; 378:1177–1188.
- [39] Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3219-26.
- [40] Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2016;27(8):1386-422.

- [41] Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013;369(11):1023-34.
- [42] André T, Shiu KK, Kim TW, et al. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability–High Advanced Colorectal Cancer (KEYNOTE-177). *N Engl J Med*. 2020; 383:2207–2218.
- [43] Siena S, Sartore-Bianchi A, Marsoni S, Hurwitz HI, McCall SJ, Penault-Llorca F, et al. Trastuzumab plus lapatinib in HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(6):738-46.
- [44] Benson AB 3rd, Venook AP, Al-Hawary MM, Arain MA, Chen YJ, Ciombor KK, et al. Colon cancer, version 2.2021, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2021;19(3):329-59.
- [45] André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med*. 2004;350(23):2343-51.
- [46] Pachman DR, Qin R, Seisler DK, Smith EM, Beutler AS, Ta LE, et al. Clinical course of oxaliplatin-induced neuropathy: results from the randomized phase III trial N08CB (Alliance). *J Clin Oncol*. 2015;33(30):3416-22.
- [47] Pachman DR, Qin R, Seisler DK, Smith EM, Beutler AS, Ta LE, et al. Clinical course of oxaliplatin-induced neuropathy: results from the randomized phase III trial N08CB (Alliance). *J Clin Oncol*. 2015;33(30):3416-22.
- [48] Haller DG, Tabernero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid plus oxaliplatin as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(11):1465-71.
- [49] Iveson TJ, Sobrero AF, Yoshino T, Souglakos I, Ou FS, Meyers JP, et al. Duration of adjuvant doublet chemotherapy (3 or 6 months) in patients with high-risk stage II colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2021;39(6):631-41.
- [50] National Research Council (US). Toward precision medicine: building a knowledge network for biomedical research and a new taxonomy of disease. Washington (DC): National Academies Press; 2011.

- [51] Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discov.* 2016;6(5):479-91.
- [52] Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(9):531-48.
- [53] Wang Y, Springer S, Zhang M, McMahon KW, Kinde I, Dobbyn L, et al. Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid of patients with primary tumors of the brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(31):9704-9.
- [54] Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet.* 2019;20(2):71–88.
- [55] Sandeep Sisodiya Liquid Biopsies: Emerging role and clinical applications in solid tumours, 2023.
- [56] Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem.* 2015;61(1):112-23.
- [57] Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology.* 2017.
- [58] Parikh AR, Van Seventer EE, Siravegna G, Hartwig AV, Jaimovich A, He Y, et al. Minimal residual disease detection using a plasma-only circulating tumor DNA assay in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2021;27(20):5586-94.
- [59] Cristiano S, Leal A, Phallen J, Fiksel J, Adleff V, Bruhm DC, et al. Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. *Nature.* 2019;570(7761):385-9.
- [60] Vidal J, Muinelo L, Dalmases A, Jones F, Edelstein D, Iglesias M, et al. Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol.* 2017;28(6):1325-32.
- [61] Lone SN, Nisar S, Masoodi T, Singh M, Rizwan A, Hashem S, et al. Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Mol Cancer.* 2022;21(1):79. doi: 10.1186/s12943-022-01543-7.
- [62] Kasi PM, Fehringer G, Taniguchi H, Chen E, Zhu AX, et al. Circulating tumor DNA and minimal residual disease in colorectal cancer: clinical implications. *J Clin Oncol.* 2023;41(6):1115-24.

- [63] Tie J, Cohen JD, Lo SN, Wang Y, Christie M, Simons K, et al. Circulating tumor DNA guided management of stage II colon cancer. *N Engl J Med*. 2022;386(24):2261-72.
- [64] Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease — latest advances and implications for cure. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019.
- [65] Merker JD et al. Circulating tumor DNA analysis in patients with cancer: ASCO review. *J Clin Oncol*. 2018.
- [66] Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer*. 2007.
- [67] Jamal-Hanjani M et al. Tracking the evolution of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2017.
- [68] Diehl F et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008.
- [69] Wan JCM et al. Liquid biopsies come of age. *Nat Rev Cancer*. 2017.
- [70] Reinert T, Henriksen TV, Christensen E, et al. Analysis of plasma cell-free DNA by ultradeep sequencing in patients with stages I to III colorectal cancer. *JAMA Oncol*. 2019;5(8):1124–1131.
- [71] Tie J, Wang Y, Tomasetti C, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med*. 2016;8(346):346ra92.
- [72] Reinert T, Henriksen TV, Christensen E, Sharma S, Salari R, Sethi H, et al. Analysis of plasma cell-free DNA by ultradeep sequencing in patients with stages I to III colorectal cancer. *JAMA Oncol*. 2019;5(8):1124-1131.
- [73] Henriksen TV, Reinert T, Christensen E, Sethi H, Birkenkamp-Demtröder K, Nordentoft I, et al. Circulating tumor DNA in stage III colorectal cancer, beyond minimal residual disease detection, toward assessment of adjuvant therapy efficacy and clinical behavior of recurrences. *Clin Cancer Res*. 2022;28(3):507-517.
- [74] Kotani D, Oki E, Nakamura Y, Yukami H, Mishima S, Bando H, et al. Molecular residual disease and efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with colorectal cancer. *Nat Med*. 2023;29(1):127-134.

- [75] Fletcher RH, Fletcher SW, Fletcher GS. Clinical epidemiology: the essentials. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2020.
- [76] Higgins JPT, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ, Welch VA, editors. Cochrane handbook for systematic reviews of interventions. Version 6.3. London: Cochrane; 2022.
- [77] European Medicines Agency (EMA). Guideline for good clinical practice E6(R2). Amsterdam: EMA; 2017.
- [78] European Medicines Agency. Transparency and publication of clinical trial data under the Clinical Trials Regulation. Amsterdam: EMA; 2022.
- [79] Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA). Compiti e funzioni dell'Agenzia Italiana del Farmaco. Roma: AIFA
- [80] Zerhouni EA. Translational and clinical science—time for a new vision. *N Engl J Med*. 2005;353(15):1621-3
- [81] Schilsky RL. Implementing personalized cancer care. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(7):432-8.
- [82] Illumina, Inc. TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) CE-IVD data sheet. M-EMEA 00069 v8.0. San Diego (CA): Illumina, Inc.; 2021. [83] National Institute for Health and Care Excellence (NICE). Signatera for detecting molecular residual disease after treatment of colorectal cancer. Medtech Innovation Briefing (MIB307). 2022.
- [84] Natera, Inc. Signatera™ MRD Assay – Technical Information and Validation Data (Technical White Paper).
- [85] Reinert T, Henriksen TV, Christensen E, et al. Analysis of Plasma Cell-Free DNA by Ultradeep Sequencing in Patients With Stages I to III Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2021;27(20):5586–5594.
- [86] Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM). RECIST in the pocket. Milano: AIOM; 2011.
- [87] Montagut C, Sartore-Bianchi A, Elez E, Stintzing S. The SAGITTARIUS trial: a precision medicine trial leveraging blood-based tumor genomics to optimize treatment in operable stage III and high-risk stage II colon cancer patients. IFOM Protocol IFOM-CPT009/2022/PO008.

- [88] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71:209-249.
- [89] Valle L. Recent discoveries in the genetics of familial colorectal cancer and polyposis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2017; 15:809-819.
- [90] Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010; 138:2073-2087.
- [91] Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990; 61:759-767.