



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA**  
**FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**  
**DIPARTIMENTO DI SPECIALITÀ MEDICO-CHIRURGICHE**  
**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE OTORINOLARINGOIATRICHE E AUDIOLOGICHE**  
**Sezione di Otorinolaringoiatria**  
*Direttore: Prof. A. Serra*  
**XXIII CICLO**

---

**Dott.ssa Angelica Brancaforte**

**STUDIO DEL RUOLO CLINICO-PROGNOSTICO DI MARCATORI  
ANTI-TUMORALI NEI CARCINOMI CERVICO-FACCIALI**

—————  
**TESI DI DOTTORATO**  
—————

**Coordinatore: Ch.mo Prof. A. Serra**

**Tutor: Ch.mo Prof. A. Serra**

---

**Anno Accademico 2009 - 2010**

## INTRODUZIONE

Le neoplasie del distretto testa-collo rappresentano un'entità nosologica la cui importanza non è univocamente fondata sugli aspetti clinico-prognostici, ma anche su quelli epidemiologici e prognostici.

Quanto sopra riferito trova ampio riscontro in letteratura: recenti osservazioni hanno infatti evidenziato come tali neoplasie presentino un tasso frequenziale di circa il 10% dei tumori maligni negli uomini ed il 4% nelle donne con particolare riferimento all'età giovane-adulta (1).

È importante altresì evidenziare che nonostante la relativamente facile accessibilità del distretto testa-collo la diagnosi di tali neoplasie è spesso tardiva, e la relativa prognosi non è migliorata negli ultimi decenni (4).

Le conoscenze sulla cancerogenesi hanno negli ultimi anni ricevuto particolare impulso: sempre più dettagliate infatti appaiono le modificazioni geniche e molecolari che possono essere alla base della trasformazione neoplastica.

Quanto sopra stimola fortemente sia la ricerca cosiddetta di base che quella clinica: nelle neoplasie della testa e collo in particolare si perseguono due obiettivi: la prevenzione e la definizione dei fattori prognostici.

A tal proposito si sottolinea come alcuni degli studi più significativi di chemioprevenzione riguardano proprio le neoplasie delle vie aeree e digestive superiori. I due campi di ricerca sono strettamente correlati, poiché, teoricamente, monitorando le modificazioni dei fattori prognostici più significativi, in particolare

genici e molecolari, si potrebbero testare e validare in tempi brevi agenti chemiopreventivi efficaci.

Alcune di queste conoscenze sono già saldamente consolidate e devono essere applicate nella clinica; altre richiedono studi più approfonditi per essere validate ed applicate nella metodica usuale. La speranza di potere personalizzare la terapia delle neoplasie cervico-facciali, adattandola alla aggressività biologica della malattia, mediante queste informazioni crea notevoli difficoltà. Infatti spesso vengono eseguiti routinariamente costosi test ancora sperimentali, il cui significato predittivo è tutto da valutare, mentre altri fattori ormai consolidati sono trascurati nella stadiazione e nella programmazione terapeutica.

Idealmente un fattore prognostico dovrebbe fornire, mediante test di facile esecuzione e poco costosi, informazioni affidabili sulla evolutività di ogni singola neoplasia e sulla sua possibile risposta alle varie opzioni terapeutiche allo scopo di programmare la strategia terapeutica ed il follow-up ottimali.

Attualmente questo elemento ideale non è disponibile: si è in grado di ottenere informazioni prognostiche dall'esame di alcuni fattori clinici, patologici e molecolari, ma esiste una notevole confusione riguardo al loro significato ed alle possibili applicazioni nell'ambito clinico. Non è sempre chiaro quale test sia significativo, quando debba essere eseguito e come possa influire sulle scelte terapeutiche.

Il maggiore motivo di confusione è legato al fatto che i termini fattore di rischio, prognostico, predittivo, marker, biomarker, intermediate-end-point, riferiti ai singoli fattori esaminati, sono spesso utilizzati come sinonimi. In realtà essi hanno differenti significati, anche se uno stesso fattore può apparire in diverse categorie.

Il processo di cancerogenesi nei carcinomi spinocellulari delle vie aeree e digestive superiori è infatti multifasico e la presenza o la comparsa di uno o più fattori è indicativa della progressione della neoplasia dalla fase preclinica a quella clinica. Tali fattori possono essere *relativi al paziente* (età, sesso, performance status, familiarità); *insiti nella neoplasia* (sede e dimensioni della neoplasia, numero e livello dei linfonodi metastatici, istopatologia, biologia molecolare) e *legati alla terapia* (Tpot, Labelling Index, p53).

Tra questi ultimi fattori si possono considerare, in senso lato, anche le scelte terapeutiche: infatti una terapia inadeguata o mal condotta condiziona inevitabilmente la prognosi ed in particolare l'evoluzione loco-regionale.

Allo scopo di fornire utili indicazioni riguardo alla loro utilizzazione routinaria in clinica essi saranno classificanti in:

a) Fattori sicuramente significativi. Sono riconosciuti come affidabili e predittivi dell'evoluitività della neoplasia da tutti gli autori. Devono essere sempre valutati e segnalati nelle cartelle cliniche: allo stato attuale rappresentano lo standard clinico minimo richiesto.

b)Fattori probabilmente significativi. Non vi è unanimità sulla loro significatività.

Anche se tecnicamente eseguibili di routine in ogni laboratorio, meritano ulteriori valutazioni mediante studi clinici.

c)Fattori sperimentali. Clinicamente promettenti, ma valutabili con test complessi, non ancora standardizzati. Non vanno usati nella pratica clinica, ma solo in studi di fase I o II in centri specialistici.

Alla luce di quanto sopra riferito, appare quindi quanto mai opportuno individuare, mediante studi correlativi clinici e di biologia molecolare, il ruolo di definizione clinico-prognostica che alcuni specifici elementi, quali la proteina p53 ed i relativi anticorpi, possono svolgere nel contesto di processi neoplastici insidiosi, anche sotto il profilo prognostico, quali quelli del distretto cervico-cefalico.

La storia naturale dei carcinomi del distretto cervico-facciale consiste nell'evoluzione clinica degli stessi in assenza di ogni forma di trattamento. Essa riflette il «ritmo proliferante» delle cellule tumorali, ritmo che sappiamo essere differente nelle varie fasi della crescita neoplastica, e la capacità che il tumore acquisisce di diffondersi a distanza. Quest'ultima, per i carcinomi di testa e collo, si evidenzia principalmente a livello loco-regionale, a livello cioè dei linfonodi latero-cervicali.

Studi condotti nel Regno Unito dimostrano come pazienti affetti da carcinoma del distretto cervico-facciale (HNC) in stadio avanzato abbiano un'aspettativa di vita, senza trattamento, di 6-12 mesi. La letteratura è abbastanza scarsa, se si escludono il

cavo orale e la laringe, ove per la facilità di ispezione clinica o per la precocità dei sintomi, esistono maggiori studi circa l'evoluzione in assenza di trattamento delle lesioni precancerose o del carcinoma in situ (2 12 13). possiamo pertanto affermare che, ad oggi, risulta ancora difficile misurare tutti gli effetti del trattamento sull'HNC, in quanto la storia naturale dello stesso non è pienamente conosciuta ed è variabilmente legata alle differenze di sede, come appunto accade per il distretto cervico-facciale. Alcuni fattori condizionanti la storia naturale dell'HNC sono:

- fattori anatomici;
- istotipo e grading tumorale.

#### *FATTORI ANATOMICI*

La maggioranza dei carcinomi squamosi iniziano quali lesioni di superficie, ma occasionalmente possono svilupparsi dai dotti delle ghiandole salivari minori, nel qual caso essi originano al di sotto della superficie della mucosa. Ciò avviene solo in alcune sedi particolari, come il pavimento orale, la base della lingua ed il rinofaringe. L'estensione del tumore primitivo avviene secondo modalità differenti, dipendendo essenzialmente dal tessuto sottostante la mucosa in cui il carcinoma si sviluppa. Se il tessuto sottostante è muscolare, l'estensione avviene essenzialmente e rapidamente lungo le fibre muscolari ( cancro della lingua). Se il tessuto sottostante è osso o cartilagine ( carcinoma laringeo) l'estensione è influenzata dai cosiddetti

punti di resistenza e di debolezza. Se il tessuto sottostante è linfatico, l'estensione avviene molto facilmente nel del tessuto linfatico stesso.

### *ISTOTIPO E GRADING TUMORALE*

La multiformità dei tessuti presenti nel distretto cervico-facciale determina la differente frequenza dei vari istotipi tumorali, caratterizzati a loro volta da comportamenti biologici e modalità evolutive peculiari (4). L'istotipo più frequente ed ugualmente distribuito nelle varie sedi è il carcinoma squamoso, che presenta spiccata tendenza all'evoluzione linfatica cervicale e più raramente alla metastizzazione per via ematica. Entità a se stante è rappresentata dal carcinoma indifferenziato rinofaringeo, il cui comportamento, analogamente a tutte le sedi anatomiche in cui la mucosa ricopre abbondante tessuto linfatico, è caratterizzato da una grande tendenza alla metastizzazione linfonodale loco-regionale ( 80%) e da una maggiore percentuale di metastasi per via ematica (28%).

### **SENI PARANASALI**

Le neoplasie maligne delle cavità nasali e dei seni paranasali vengono riunite in un unico paragrafo in quanto l'unità embriologica, anatomica e clinica esistente ne condiziona la storia naturale ed influenza la scelta del trattamento terapeutico. Si tratta di una sede appartenente alla seconda categoria, secondo la stratificazione di Myers, ove la mucosa ricopre essenzialmente osso. La storia naturale è fortemente

correlata all'istotipo ed è caratterizzata da una buona incidenza di metastasi linfonodali.

## **RINOFARINGE**

Il rinofaringe «classicamente» rappresenta l'emblema di quelle sedi che Myers contempla nella prima categoria, ove la mucosa ricopre abbondante tessuto linfoide e si riscontra un'elevata incidenza di tumori indifferenziati. I tumori maligni nasofaringei possono insorgere su qualsiasi delle pareti del rinofaringe, con frequenza diversa nelle varie sedi. Le neoplasie maligne rinofaringee tendono ad invadere le formazioni anatomiche contigue, diffondendosi anteriormente, lateralmente e posteriormente.

L'invasione endocranica può avvenire attraverso:

- seno sfenoidale
- tuba uditiva
- grande ala dello sfenoide
- foglietto posteriore dell'aponevrosi salpingo-faringea
- fori della base cranica.

## **CAVO ORALE**

Nell'analisi della storia naturale dei carcinomi del cavo orale occorre ricordare che, analogamente alla laringe, si riscontra una netta correlazione fra la prevalenza di

lesioni precancerose e carcinomi invasivi 4. Tale correlazione può essere riscontrata nell'analisi dell'età media di incidenza delle precancerosi orali, che precede mediamente di circa 10 anni l'età media di incidenza del carcinoma invasivo. Pertanto, seppure tali osservazioni non risolvano la questione se il carcinoma orale derivi da una lesione precancerosa, si può affermare che nell'ambito del distretto cervico-facciale questa risulta la sede dove ciò avviene più frequentemente. La sede orale appartiene tipicamente alla seconda categoria di Myers, ovvero è una sede ove la mucosa ricopre essenzialmente osso e muscolatura.

## **Lingua**

La lingua rappresenta una delle sedi più frequentemente interessate dai tumori del cavo orale (dal 17,5% al 36% dei casi) (10). Le lesioni iniziali sono localizzate principalmente nei 2/3 posteriori della superficie ventrale e marginale della lingua; rari sono i carcinomi del dorso linguale. Questa distribuzione corrisponde alle aree linguali provviste di uno strato di epitelio squamoso, privo di cheratina, con una lamina propria sottile ed una sottomucosa contenente tessuto adiposo e ghiandole 8. La mucosa del dorso, viceversa, si presenta cheratinizzata e strettamente aderente al tessuto muscolare sottostante, senza interposizione della sottomucosa. Nell'evoluzione dei tumori maligni linguali, esiste sempre un'evidente sproporzione tra estensione superficiale e sviluppo in profondità. Le modalità di crescita, infatti, sono diverse a seconda che si tratti di forme vegetanti o infiltranti. Nel primo caso,

generalmente, l'estensione superficiale è maggiore di quella profonda; nelle forme infiltranti, invece, l'estensione profonda supera sempre quella obiettiva bile in superficie. Altra importante caratteristica delle neoplasie maligne linguali è la frequente e documentata plurifocalità, che si può manifestare sotto forma di lesioni distinte separate da mucosa di aspetto normale o come focolai neoplastici multipli, distinti nell'ambito di un'unica area eritro/leucoplasia. La confluenza di lesioni inizialmente distinte, naturalmente, incrementa l'estensione superficiale del tumore. Altre sedi del cavo orale di possibile origine di carcinomi sono: palato duro, pavimento orale, mucosa geniena, trigono retro molare, regione delle fauci, gengiva.

## **OROFARINGE**

I tumori maligni dell'orofaringe rappresentano circa il 3% di tutti i tumori solidi (loggia tonsillare, palato molle, parete posteriore dell'orofaringe, base lingua). La sede orofaringea assume caratteristiche di entrambe le categorie descritte da Myers, essendo comunque una sede ove è presente abbondante tessuto linfoide. La tonsilla ed il pilastro anteriore sono le sedi più frequenti di insorgenza di neoplasie maligne dell'orofaringe; rara è la localizzazione primitiva al pilastro tonsillare posteriore. Generalmente i tumori maligni interessano la faccia anteriore del palato molle. Quella posteriore raramente è sede di una lesione primitiva; più comunemente è coinvolta secondariamente per continuità o per contiguità. Durante l'accrescimento, l'ostacolo all'infiltrazione profonda della neoplasia, rappresentato dall'aponevrosi

palatina, facilita la diffusione tumorale in superficie, con superamento frequente della linea mediana.

I tumori maligni che originano a livello della base lingua tendono a rimanere per lungo tempo piccoli in superficie, manifestando viceversa chiara espressione infiltrativa nei confronti della muscolatura propria della lingua. Non è infrequente il riscontro di tumori superficialmente limitati che, viceversa, presentano uno sviluppo profondo, «ad iceberg», con ampia colonizzazione del pavimento muscolare della bocca e delle logge pre-viscerali del collo.

## **IPOFARINGE ED ESOFAGO CERVICALE**

I tumori maligni dell'ipofaringe e dell'esofago cervicale rappresentano il 5-10% delle neoplasie che possono insorgere a livello delle vie aereo-digestive superiori (VADS). A fronte di una sintomatologia d'esordio piuttosto scarsa, questi tumori si caratterizzano per un comportamento biologico aggressivo locale, con precoce metastizzazione linfonodale loco-regionale. Quando, infatti, la lesione iniziale riesce a superare il piano sottomucoso, l'unica barriera all'infiltrazione neoplastica profonda è rappresentata solo dal tenue strato muscolare, offrendo, invece, molte vie di diffusione attraverso la ricca vascolarizzazione linfatica regionale. La sede è classificabile come appartenente alla seconda categoria di Myers, anche se in questo caso si riscontra una percentuale di metastasi linfonodali latero-cervicali pari praticamente a quelle tipiche della prima categoria. Nel 70% dei casi i tumori

maligni ipofaringei insorgono a livello di un seno piriforme; nel rimanente 20-30% dei casi si sviluppano sulla superficie faringea posteriore o laterale nell'area retrocricoidea.

Il cancro esofageo è caratterizzato dalla peculiare capacità di estensione a distanza dall'epicentro tumorale, sia per contiguità con il fronte tumorale primitivo, sia per colonizzazione linfatica. Nella sua progressiva evoluzione, la neoplasia può interessare le strutture contigue, quali ipofaringe, laringe, trachea, tiroide, nervo laringeo inferiore e grandi vasi del collo, con più frequente incarceramento delle arterie e compressione delle vene (11).

## **PRECANCEROSI DELLA LARINGE**

Risulta molto difficile correlare l'obiettività clinica delle diverse precancerosi laringee con criteri di possibilità evolutiva in senso neoplastico. Dal punto di vista macroscopico distinguiamo forme cliniche che solo eccezionalmente (laringiti croniche catarrali ed ipertrofiche) possono subire un'evoluzione maligna da altre dotate di potenzialità neoplastica maggiore (eritroplachie, leucoplachie). La conoscenza della storia naturale delle precancerosi laringee è un dato di estrema importanza con implicazioni dirette per l'orientamento diagnostico, terapeutico e preventivo 5. Un aiuto estremamente valido ci deriva dal raffronto della loro prevalenza in popolazioni di fumatori, con la prevalenza del carcinoma invasivo in popolazioni con analoghe caratteristiche di esposizione al fumo di tabacco.

Sappiamo che nei fumatori il rischio di sviluppare un carcinoma invasivo laringeo è circa il 4% e che gli stessi fumatori presentano un rischio di sviluppare un carcinoma in situ che è di 4 volte superiore rispetto al rischio di sviluppare un carcinoma invasivo. La durata di queste fasi tuttavia può essere molto variabile. Vi sono casi in cui la fase di carcinoma in situ manca, oppure è molto breve. In tali casi non sarebbe possibile il riconoscimento clinico del carcinoma invasivo. D'altro canto è verosimile che casi di displasia o di carcinoma in situ non solo progrediscono verso stadi più avanzati ma che regrediscono addirittura verso stadi più precoci. Un parametro importante che emerge dall'analisi della prevalenza delle lesioni precancerose è che le stesse sono da considerarsi a tutti gli effetti uno dei gradini di un processo carcinogenetico complesso e non solo tappa obbligata di avvicinamento.

## **LARINGE**

Il carcinoma della laringe costituisce il 25-28% dei tumori delle VADS. Dal punto di vista istopatologico, l'epitelioma spinocellulare, a vario grado di differenziazione, rappresenta l'istotipo di più frequente riscontro (97% dei casi). Solo raramente si osservano forme indifferenziate e casi di adenocarcinoma. Macroscopicamente, la neoplasia può presentare carattere vegetante, con aspetto a cavolfiore, facilmente sanguinante, o infiltrativi, con tendenza ad interessare i tessuti laringei. La forma ulcerativa deriva di solito dalle precedenti due, di cui costituisce, in un certo senso, l'inevitabile evoluzione. Considerazioni di ordine embriologico, funzionale e clinico

consentono di individuare nella laringe due settori separati dal piano glottico: la regione sovraglottica e la regione sottoglottica. Da una revisione della Letteratura, la distribuzione per sede di presentazione è così valutabile: sovraglottica 46%, glottica 25%, sottoglottica 3% 7. Il processo neoplastico, insorto in una sottosedo, nella sua evoluzione tende a seguire le vie di minore resistenza anatomica. Esistono strutture che, entro certi limiti, riescono a contenere l'estensione intra ed extralaringea della malattia. Tra le prime un ruolo fondamentale è svolto dal cono elastico, che almeno nelle fasi iniziali di crescita neoplastica, impedisce il passaggio di tumori insorti a livello del ventricolo o dello spazio paraglottico verso la sottoglottide. Strutture che, viceversa, fungono da barriera all'estensione estrinseca della malattia sono le cartilagini tiroidea e cricoidea che, tuttavia, con l' invecchiamento possono presentare aree di metaplasia ossea, con permeazione vascolare, che rendono possibile l'invasione neoplastica della cartilagine (3). Altre importanti barriere anatomiche all'evoluzione extralaringea della malattia sono rappresentate dalla membrana joepiglottica, e la membrana tiroioidea, rispettivamente tetto e parete anteriore della loggia jotiro-epiglottica. Nell'ambito della laringe esistono, poi, punti di minore resistenza quali:

- la commessura anteriore;
- la membrana cricotiroidea;
- l'epiglottide;
- lo spazio paraglottico.

La localizzazione alla zona vestibolare si osserva nel 35-40% dei casi. Nelle forme inizialmente localizzate alle parti laterali del vestibolo laringeo, la neoplasia può raggiungere il seno piriforme, sia penetrando a tutto spessore il muro ari-epiglottico, che invadendo e superando il margine libero delle pliche ari-epiglottiche. La diffusione verso la regione aritenoidea o verso la regione glottica è possibile, ma non frequente né precoce.

I tumori maligni della zona ventricolare rappresentano il 10% dei carcinomi laringei. La loro diffusione verso l'esterno trova spesso una valida barriera nella lamina tiroidea, che dirige la neoplasia verso l'alto o in basso verso lo spazio paraglottico. Anteriormente la malattia può giungere ad interessare la commessura anteriore, estendendosi a ferro di cavallo all'emilaringe opposta.

I carcinomi della zona cordale costituiscono circa il 25% dei tumori maligni laringei; la localizzazione più frequente corrisponde al bordo libero della corda vocale vera (1).

Dalla primitiva sede la neoplasia può estendersi:

- lungo la corda vocale, invadendo la commessura anteriore e la corda vocale controlaterale;
- inferiormente, verso la regione sottoglottica;
- posteriormente, a raggiungere la regione interaritenoidea;
- lateralmente, con interessamento del ventricolo laringeo;
- superiormente, verso il vestibolo.

La localizzazione commessurale anteriore isolata è abbastanza rara, risultando presente solo nell'1-2% dei casi. I tumori maligni di questa sede tendono a diffondersi in tutte le direzioni, interessando contemporaneamente le corde vocali vere e quelle false, i ventricoli, il piede dell'epiglottide e la regione sottoglottica. La localizzazione a livello della regione sottoglottica è riscontrabile nel 2-3% dei carcinomi laringei. Le neoplasie insorte nella parte anteriore di questa sede possono perforare la membrana crico-tiroidea ed invadere la cute; la diffusione verso la bocca dell'esofago è più rara, come pure tardiva è l'osservazione di una diffusione del tumore in alto, verso le corde vocali ed in basso verso la trachea (9).

Discorso a parte meritano i carcinomi marginali, che più frequentemente interessano il margine libero dell'epiglottide. Essi possono estendersi:

- inferiormente, interessando il vestibolo laringeo;
- lateralmente, verso la plica faringo-epiglottica;
- anteriormente, a raggiungere la faccia linguale dell'epiglottide, le vallecule glosso-epiglottiche e la base della lingua.

## **MARCATORI TUMORALI CIRCOLANTI:DEFINIZIONE E CRITERI DI UTILIZZO**

Il primo studio in cui venne proposta la misurazione di un parametro biochimico come indicatore di tumore risale ad oltre 50 anni fa e riguarda la fosfatasi acida nel carcinoma prostatico.

Solo negli anni '60, tuttavia, con l'identificazione dell'antigene carcinoembrionario (CEA) e dell'alfafetoproteina (AFP) i biomarcatori hanno iniziato quel processo di diffusione che li ha portati ad una estesa utilizzazione nella ricerca biomedica come nella pratica clinica oncologica.

Una imponente massa di dati ha conferito una crescente importanza alle tecniche analitiche in grado di misurare, nel sangue ed in altri liquidi biologici, le alterazioni indotte da neoplasie maligne. D'altro canto studi controllati ed esperienza clinica hanno contribuito alla critica delle ipotesi iniziali sui biomarcatori ed alla contemporanea ridefinizione del concetto stesso, biochimico e fisiopatologico, di indicatore tumorale e del corretto impiego clinico di queste molecole.

In termini teorici un marcatore tumorale ottimale potrebbe essere definito come il prodotto specifico di cellule tumorali o in via di trasformazione cancerogena non riscontrabile nell'organismo di soggetti sani o affetti da patologie non neoplastiche (55).

In tale situazione il marcatore potrebbe, con ampia affidabilità costituire un ausilio sufficiente per:

- diagnosi precoce di neoplasia e/o di forme precancerose
- diagnosi differenziale
- valutazione radicalità ed efficacia delle terapie oncologiche
- riscontro precoce delle recidive.

La realtà clinica ci offre tuttavia un quadro significativamente differente dalle premesse teoriche poiché non è disponibile alcun marcatore tumore specifico in senso assoluto.

I biomarcatori utilizzati sono infatti sostanze già presenti nell'organismo in condizioni di normalità e di patologia non oncologica, peraltro con ampie fluttuazioni, la cui presenza nei liquidi biologici presenta modificazioni quantitative sensibili in presenza di determinate neoplasie (56).

Pertanto la presunta tumore-specificità si fonda, di fatto, solo su una modulazione differenziale del biomarcatore in presenza o assenza di neoplasia: la presenza in circolo di una quota dell'indicatore prodotto dai compartimenti extra-neoplastici crea inoltre un rumore di fondo che diminuisce la sensibilità del biomarcatore (57).

Infine, escludendo alcuni casi specifici rappresentati dall'antigene prostatico specifico (PSA) per il tessuto prostatico, l'enolasi neurone specifica (INSE) per i tessuti di derivazione neuroendocrina, la calcitonina (CT) per le cellule C

parafollicolari tiroidee e poche altre molecole, l'assenza di organo specificità non permette una assoluta associazione fra elevazione dei marcatori e definizione di una sede anatomica di origine della neoplasia (58).

Sulla base di queste premesse si articolano gli attuali orientamenti sulla classificazione e sull'impiego clinico dei biomarcatori.

### **Classificazione dei biomarcatori**

La classe degli indicatori tumorali è costituita da molecole eterogenee dal punto di vista biochimico e strutturale: una classificazione basata su questi presupposti è quindi poco utile da un punto di vista operativo.

Riteniamo più indicato fornire una classificazione operativa nella quale i marcatori sono riuniti per prerogative, e conseguenti applicazioni cliniche, comuni.

#### ***Marcatori onco-fetali***

Sono rappresentati dall'antigene carcinoembrionario (CEA) e dall'alfafetoproteina (AFP), la cui produzione è normalmente limitata al periodo embriofetale ed è di pertinenza dei tessuti di derivazione endodermica.

Recenti acquisizioni biomolecolari hanno permesso di iscrivere il CEA nella superfamiglia delle immunoglobuline: il suo ruolo si esplica principalmente nella regolazione dei fenomeni di adesività cellulare ma partecipa anche ai processi differenziativi ed al mantenimento dell'omeostasi cellulare (59).

Elevati livelli di CEA sono dimostrati soprattutto in pazienti affetti da carcinoma del colon ma anche in patologie oncologiche di altri distretti (polmone, mammella, apparato uro-genitale, tratto gastro-enterico e ghiandole annesse ...) (60, 61, 62).

L'AFP è una glicoproteina normalmente sintetizzata dal fegato, dal sacco vitellino e dall'epitelio intestinale durante la vita fetale. Le neoplasie di cui l'AFP può essere considerata un marcatore sono tumori di derivazione epatocitaria, dagli elementi del sacco vitellino ed i teratocarcinomi (63, 64).

### ***Marcatori tessuto-specifici***

Comprendono un eterogeneo gruppo di molecole accomunate da una produzione tessuto specifica che consente in ogni caso di risalire alla fonte di produzione.

La differenziazione tra tessuto normale, iperplasico o neoplastico è anche in questo caso di tipo quantitativo tuttavia livelli elevati di questi marcatori consentono di indirizzare gli accertamenti clinici su organi bersaglio specifici (65).

Inoltre, poiché la concentrazione di questi marcatori è riferibile alla attività metabolica o proliferativa di un solo tipo tissutale questi marcatori si prestano perfettamente al monitoraggio successivo a terapie chirurgiche o radiochemioterapiche radicali: in questo caso i marcatori tessuto-specifici sono indosabili ed un loro incremento può essere riferito solo ad una ripresa della malattia (66).

Si riporta di seguito una schema dei principali marcatori tessuto-specifici e delle loro applicazioni cliniche:

**beta-HCG:** coriocarcinoma, tumori germinali del testicolo (67)

**Calcitonina:** carcinoma midollare della tiroide (68)

**NSE:** microcitoma polmonare, neuroblastoma (69, 70)

**PSA:** carcinoma della prostata (71).

### ***Marcatori mucinici***

La famiglia delle mucine comprende un rilevante numero di molecole glicoproteiche ad elevato peso molecolare, con prevalente contenuto in carboidrati prodotte quali normali componenti delle secrezioni ghiandolari di tipo mucinoso (72).

Solo una piccolissima quantità di mucine passa in circolo nei soggetti normali mentre i processi di trasformazione neoplastica, favorendo la perdita della polarità secretoria delle cellule mucipare, determinano il passaggio in circolo di quote rilevanti di queste sostanze che per questo motivo vengono utilizzate quali indicatori biochimici di tumore (CA 125, CA 15.3, CA 19.9, MCA, CA 549 ...) (73, 74, 75).

Numerosi studi realizzati utilizzando reagenti monoclonali hanno permesso di dimostrare come, anche se alcuni epitopi mucinici sono associati in senso preferenziale ad alcuni istotipi tumorali epiteliali, la

presenza di tali epitopi è dimostrabile anche in altri tipi tumorali: pertanto questi marcatori non possono essere considerati specifici ma piuttosto ad espressione “preferenziale” da parte di alcune neoplasie (76).

E' evidente quindi che il loro utilizzo non è prevedibile in fase di diagnosi o, a maggior ragione, di screening: tuttavia essendo la produzione dell'indicatore funzione del numero di cellule tumorali ovvero della massa tumorale, le mucine trovano indicazione nella stadiazione e, soprattutto nel follow up di pazienti con neoplasie epiteliali, utilizzando per ciascun istotipo il marcatore ad espressione preferenziale (es. CA 125 nel carcinoma ovarico).

### ***Marcatori citocheratinici***

Le citocheratine costituiscono una famiglia di proteine classificata tra i cosiddetti filamenti intermedi, così denominati in rapporto alla loro dimensione che si colloca tra quella dei microtubuli e dei microfilamenti, insieme ai quali costituiscono il citoscheletro, implicato non solo in funzioni strutturali ma anche in una serie di fenomeni dinamici di vitale importanza per l'omeostasi cellulare quali la divisione, la secrezione, l'adesione, la fagocitosi e la crescita cellulare (77).

I filamenti intermedi sono costituiti da subunità proteiche organizzate secondo una struttura ad alfa-elica: ciascuna di esse contiene un dominio centrale che forma una rigida struttura spiraliforme quando la molecola dimerizza. Le varie

strutture dimeriche si associano a formare i filamenti intermedi che, oltre alle citocheratine, comprendono i neurofilamenti, i filamenti gliali acidi degli astrociti e delle cellule di Schwann, i filamenti di desmina e di vimentina (78).

Dall'analisi della struttura secondaria emerge come le differenze dimensionali e funzionali dei filamenti intermedi risiedano nella variabilità dei due domini terminali (79).

I filamenti cheratinici epiteliali costituiscono una famiglia di proteine simili per struttura ed altamente conservate filogeneticamente: i vari membri di questa famiglia posseggono simili caratteristiche biochimiche ed immunologiche e possono essere suddivise in due sottotipi principali:

- tipo I: PM variabile da 40 kD a 56.5 kD, acide
- tipo II: PM variabile da 53 kD a 67 kD, basico-neutre

che formano eteropolimeri composti da una citocheratina di tipo I ed una di tipo II, in rapporto molare pari a 1:1.

I filamenti di citocheratine sono costituiti da polipeptidi differenti, simili all'alfa-cheratina dell'epidermide ma non identici. Queste citocheratine sono espresse in varia combinazione nei diversi epiteli: in base alla migrazione di questi polipeptidi nella gel-elettroforesi bidimensionale su preparati di citoscheletro, è possibile riconoscere diversi sottogruppi:

- polipeptidi relativamente grandi e lievemente basici tipici di molti epiteli stratificati (citocheratine 1-6); polipeptidi di dimensioni e carica intermedie (citocheratine 7-8)

presenti in differenti epitelii semplici quali l'epitelio respiratorio e quello transazionale delle vie urinarie, in alcune ghiandole composte e nelle cellule HeLa;

- polipeptidi di dimensioni intermedie o relativamente grandi ed acidi (citocheratine 9-11) presenti a livello epidermico;
- polipeptide presente nella cornea umana (citocheratina 12);
- polipeptide componente di epitelii squamosi stratificati non corneificati (citocheratina 13);
- polipeptidi epidermici di piccole dimensioni, acidi (citocheratine 14-17);
- polipeptide con distribuzione simile a quella della citocheratina 8 (citocheratina 18);
- polipeptide presente in una grande varietà di tessuti epiteliali (citocheratina 19)

(80).

La caratteristica distribuzione delle citocheratine nei diversi tipi di tessuti epiteliali ne rende possibile la distinzione e la classificazione in base al contenuto citocheratinico cellulare anche se deve essere tenuta presente la notevole eterogeneità cellulare epiteliale: nel caso della pelle, ad esempio, coesistono 7 differenti tipi cellulari (81).

L'analisi biochimica del citoscheletro di carcinomi umani mostra una differente rappresentazione di citocheratine in relazione alla diversa derivazione epiteliale, che rimane costante sia nel tumore primario che nel tessuto metastatico. I tumori epiteliali inoltre esprimono molte delle citocheratine peculiari del tipo cellulare non trasformato ed il fatto che alcune citocheratine non siano

esprese potrebbe riflettere un meccanismo di selezione di un particolare tipo cellulare rispetto a quelli presenti nel tessuto di derivazione.

Le citocheratine più frequentemente rilevate nei carcinomi sono la 8, 18 e 19 che possono essere ritrovate sia nel tessuto tumorale che nel sangue, dove sono presenti come complessi molecolari parzialmente degradati, in quanto i fenomeni di proliferazione e necrosi tumorale sono in grado di liberare frammenti citoscheletrici negli spazi extracellulari: ciò costituisce il razionale per l'utilizzo delle citocheratine come marcatori tumorali circolanti.

### ***Antigene Polipeptidico Tissutale***

L'Antigene Polipeptidico Tissutale (TPA) è stato descritto per la prima volta da Bjorklund e Bjorklund nel 1957 come un principio antigenico proteico isolato da carcinomi umani (82).

Solo negli anni '80 è stato approntato un metodo immunoradiometrico per il dosaggio del TPA che utilizzava un anticorpo policlonale contro l'antigene. L'impiego clinico di questo analita ha permesso di evidenziare elevati livelli di TPA circolante in pazienti con diverse neoplasie di derivazione epiteliale (83). Inoltre il TPA può essere dosato anche in altri liquidi biologici (urine, versamenti, liquidi di lavaggio) e questo tipo di determinazioni ha assunto a volte una rilevante importanza clinica, come nel caso del dosaggio del TPA urinario nel carcinoma della vescica (84).

L'esperienza clinica ha anche dimostrato la possibilità di innalzamento del TPA in situazioni non neoplastiche quali epatiti, cirrosi, colestasi, processi flogistici ed infettivi caratterizzati da fenomeni di citolisi con conseguente frammentazione e liberazione di parti del citoscheletro (85).

Indagini immunoistochimiche hanno dimostrato che il TPA non è specifico solo per i tessuti di natura maligna, ma è anche un normale costituente di epiteli di rivestimento di strutture duttali e canali presenti in vari organi.

La definizione della sequenza amminoacidica e la caratterizzazione biochimica del TPA hanno permesso di identificare le citocheratine 8, 18 e 19 tra le sue costituenti principali (86).

Per le prerogative biochimiche e funzionali delle citocheratine e per le modalità di rilascio di frammenti citoscheletrici durante la divisione cellulare, il TPA rappresenta un' espressione dell'attività proliferativa e necrotica della neoplasia e numerosi lavori in letteratura hanno evidenziato il suo ruolo clinico peculiare in fase di diagnosi, stadiazione e, soprattutto, formulazione prognostica e follow up in molte neoplasie epiteliali (87).

### ***Antigene Polipeptidico Tissutale Specifico***

Lo studio del TPA come target di anticorpi monoclonali ha consentito la produzione di oltre 2000 ibridomi con cellule immunizzate con l'antigene, il cui mappaggio ha portato al riconoscimento di 35 differenti epitopi.

Bjorklund ha dimostrato che solo due di questi sono essenziali nella caratterizzazione del TPA ed ha selezionato l'anticorpo monoclonale con la maggiore affinità, che riconosce l'epitopo M3 (costante di affinità 10 l/mol).

Questo epitopo è stato messo in relazione alla specificità critica dell'antigene polipeptidico tissutale e l'anticorpo monoclonale ottenuto verso questa struttura costituisce la base per il dosaggio dell'antigene polipeptidico tissutale specifico (TPS) (88).

Studi biochimici, immunologici e genetici hanno consentito una migliore caratterizzazione del TPS: mediante precipitazione, elettroforesi ed immunoblotting utilizzando l' epitopo M3 come sonda sono state dimostrate 4 bande proteiche reattive tra 12 e 42 kD in un terreno di coltura di una linea cellulare di carcinoma.

La frazione di 14 kD, maggiormente reattiva con l'M3 è stata ulteriormente purificata, ottenendo una purificazione di 50000 volte la struttura dell'epitopo M3.

L'analisi della sequenza amminoacidica del frammento proteico altamente purificato ha dimostrato una sequenza amminoacidica presente a livello di una porzione C-terminale della citocheratina 18. Mediante utilizzo di frammenti di citocheratina 18 espressi come proteine di fusione in un sistema vettore batterico pET3c la struttura dell'epitopo che reagisce con l'M3 è stata localizzata a livello della porzione coil 2 sulla citocheratina 18.

La citocheratina 18 è una proteina di tipo acido con PM 45 kD espressa nelle cellule epiteliali normali. Il frammento più abbondante nel siero di pazienti affetti da carcinoma sembra essere un peptide C-terminale (coil 2) (89).

## **Criteri di valutazione analitica dei Marcatori**

### **Tumoriali**

Come per tutti gli esami biochimici i criteri generali di valutazione della performance diagnostica sono riconducibili alla valutazione della sensibilità (percentuale di soggetti ammalati riconosciuti dal marcatore) e della specificità (percentuale di soggetti non ammalati riconosciuti come effettivamente sani dal marcatore) (90).

La valutazione di questi parametri può essere operata sia disponendo di un'unica determinazione dei livelli sierici del marcatore, sia valutando la dinamica temporale delle variazioni di concentrazione (91, 92).

Nel primo caso è necessario categorizzare il dato ricorrendo all'utilizzo di un valore soglia calcolato sulla base della distribuzione del marcatore in una popolazione di riferimento costituita da soggetti sani. Questa scelta non considera generalmente il problema derivante dagli incrementi del tasso di marcatore in patologie non neoplastiche, che genera problemi di diagnosi differenziale, o in situazioni aspecifiche non patologiche (93).

Per ovviare a questi inconvenienti la valutazione di dati singoli può avvenire riferendosi a livelli di soglia multipla che permettono un criterio interpretativo maggiormente flessibile:

a) Soglia tecnica: equivalente alla soglia classica e calcolata sulla distribuzione del marcatore in soggetti normali

b) Soglia di patologia: determina una probabile condizione di patologia, non necessariamente neoplastica

c) Soglia di allarme: determina una elevata probabilità di neoplasia.

La valutazione dinamica di più valori sequenziali del marcatore rappresenta comunque il criterio di scelta per l'ottimizzazione dell'uso clinico degli indicatori tumorali (94, 95).

Dev'essere comunque considerato il possibile apporto della quota aspecifica del marcatore circolante che può determinare apparenti modificazioni del trend di concentrazione in assenza di modificazioni della massa o della attività tumorale.

Il criterio interpretativo può essere di tipo empirico, basato sulla valutazione qualitativa delle modificazioni temporali della concentrazione del marcatore o, viceversa, il marcatore può essere dosato con precisa sequenza temporale e la variabilità analizzata mediante l'impiego di algoritmi definiti che permettano la estrapolazione di parametri quantitativi quali il tempo di dimezzamento (emivita), il tempo di duplicazione o la pendenza della retta di variazione (96).

## **Marcatori tumorali e biosistemi: un approccio compartimentale**

In condizioni normali la concentrazione di un marcatore tumorale nei fluidi biologici è funzione complessa del tasso di fisiologica produzione del marcatore da parte di organi e tessuti, dello spazio di distribuzione e dell'attività degli apparati deputati al catabolismo della molecola.

Queste caratteristiche, statiche e dinamiche, del sistema condizionano i differenti livelli del marcatore rilevabili in ciascun individuo e che, in assenza di elementi di perturbazione, tendono (entro i limiti della fluttuazione fisiologica) ad una condizione di stabilità o di equilibrio dinamico (steady state). L'alterazione di una delle tre componenti può condizionare la modificazione della concentrazione del biomarcatore circolante: la fenomenologia di queste alterazioni può essere ricondotta in un sistema modellistico rappresentativo di tipo monocompartimentale (sistema vascolare) o, con maggior realismo, bicompartimentale aperto (vascolare ed extra-vascolare) in condizioni di steady-state.

L'anomalo input nel sistema, condizionato dalla presenza della neoplasia, perturba la condizione di steady-state e determina una elevazione della concentrazione del bioindicatore. La rimozione della massa neoplastica, specialmente se radicale, consente di analizzare le caratteristiche dinamiche del sistema biologico.

Nell'ipotesi monocompartimentale sottraendo dalla concentrazione

all'equilibrio ( $T_0$ ) le concentrazioni in tempi successivi alla rimozione della neoplasia ( $T_1...T_n$ ) è possibile ottenere una funzione concentrazione-tempo con andamento esponenziale negativo:

$$C(T) = A \cdot \exp[-kT]$$

che, nel caso di ipotesi bicompartimentale, diventa:

$$C(T) = A \cdot \exp[-aT] + B \cdot \exp[-bT]$$

Nel primo caso il tasso di rinnovamento del sistema relativo al tipo di marcatore è dato da:

$$K = 0.693 / T_h$$

dove  $T_h$  esprime l'emivita della concentrazione del biomarcatore.

Nel caso di sistema bicompartimentale il tasso di rinnovamento sarà viceversa espresso da:  $K = ab / (Aa + Bb)$

dove  $a$  e  $b$  rappresentano la pendenza delle due componenti della curva concentrazione-tempo.

Dopo rimozione radicale della neoplasia il sistema si "resetta" su una nuova condizione di equilibrio dinamico che potrà essere perturbata dalla comparsa di una recidiva di malattia: in questo caso la concentrazione del biomarcatore tenderà alla crescita proporzionalmente alla proliferazione cellulare o all'aumento di massa tumorale ed alle caratteristiche del sistema.

Assumendo un modello di crescita cellulare descrivibile secondo una funzione logistica:

$$L(T) = P + K / (1 + C * \exp[-hT])$$

dove P rappresenta un asintoto che esprime la concentrazione all'equilibrio la cui prima fase può essere descritta da una funzione esponenziale:

$$N(T) = N_0 * \exp[bT]$$

presumendo un tasso di produzione cellulare costante del marcatore è possibile calcolare il tasso di crescita cellulare del marcatore dato il tasso di rinnovamento. L'incremento della concentrazione dell'indicatore tumorale è espresso dalla funzione:

$$C(T) = C_0 * \exp[zT]$$

dove:

$$z = b - K$$

Ne deriva quindi la possibilità di estrapolare il tasso di duplicazione tumorale ( $T_d$ ) dalla relazione:

$$T_d = 0.693 / b$$

In sintesi quindi l'approccio compartimentale all'analisi dei biomarcatori consente la quantificazione di dati inerenti la radicalità chirurgica, la clearance del marcatore in corso di radio-chemioterapia e la derivazione di dati relativi all'incremento di concentrazione del marcatore in corso di relapse di malattia con la possibilità di correlare il dato biochimico alla proliferazione cellulare tumorale (97, 98).

## **FATTORI PROGNOSTICI CLINICI ED ANATOMO-PATOLOGICI**

La definizione di fattore prognostico è insita nel titolo stesso, in quanto so possono definire prognostici quei fattori che sono in grado di farci prevedere il futuro della neoplasia su basi scientifiche oggettivamente validate. La predizione di un futuro più o meno grave è fatto molto importante in quanto viene a condizionare l'accuratezza del follow-up, scandendone i tempi e a determinare l'indicazione ad integrazioni terapeutiche che vengono ad aumentare le possibilità di controllo locale in caso di tumore particolarmente aggressivo.

Si possono confermare anche i criteri classificativi proposti, suddividendo:

1. Fattori prognostici relativi al paziente (età, sesso, patologie concomitanti etc.);
2. fattori prognostici relativi al tumore (staging, presenza e numero di linfonodi metastatici, loro condizione d'integrità capsulare, grading, biologia molecolare, etc.);
3. fattori prognostici legati alla terapia.

È utile inoltre fare una suddivisione tra fattori prognostici che valgono per tutti i carcinomi squamosi della testa e del collo (HNSCC) e quelli che sono propri delle varie sedi del distretto ( es. cavo orale, orofaringe etc.).

### *FATTORI PROGNOSTICI LEGATI AL PAZIENTE*

Sono ormai definiti come fattori prognostici «consolidati»:

1. Et : l'et  media di questi tumori   di 63 anni (50% tra 50 e 65 anni, 25% et  superiore ai 65 anni, 3% et  inferiore ai 40 anni).
2. Sesso: il sesso maschile   colpito circa 4 volte di pi  del sesso femminile, con un rapporto di 10/1 in et  giovane (17 19 23).
3. Abitudini di vita: il permanere, a malattia insorta, di abitudini voluttuarie ( es. fumo ed alcool) sicuramente a rischio carcinogenico, o il mantenimento di attivit  lavorative a rischio (lavorazioni con catrame ed idrocarburi aromatici, lavorazioni della gomma, del Cromo, Nichel ed Asbesto, lavorazioni del legno per gli adenocarcinomi etmoidali etc.) sono sicuramente fattori prognostici negativi (14 18).
4. Stato nutrizionale: esso si correla sicuramente con deficit immunitari.
5. Patologie concomitanti: recentissimi studi condotti su casistiche molto ampie e metodi statistici adeguati, hanno dimostrato che la comorbidit  ( riguardante soprattutto le broncopatie croniche e le epatopatie croniche)   un sicuro fattore prognostico negativo sulla sopravvivenza.
6. Stato socio-economico: un livello socio-economico pi  elevato si correla con una migliore prognosi.
7. Complicanze post operatorie: la presenza di complicanze post operatorie si correla con un decorso pi  sfavorevole della malattia (19).
8. Trasfusioni di sangue intero ( pre, intra e post operatorie).
9. Anemizzazione.

## 10. Ritardo diagnostico e terapeutico.

### *FATTORI PROGNOSTICI LEGATI AL TUMORE*

Possiamo distinguere:

- 1) Stadio di T.
- 2) Stadio di N.
- 3) Caratteristiche istologiche del T:
  - Grading
  - Altre caratteristiche istologiche. È dato ormai consolidato che gli aspetti istologici verrucosi (carcinoma verrucoso) e pseudo sarcomatosi si correlano con una prognosi discreta, e quindi possono giustificare trattamenti chirurgici decisamente conservativi (es. con l'uso del laser).
  - Embolizzazione intravasale da parte di cellule tumorali (E+) (19 28 37 59).
  - Invasione perineurale.
  - Presenza di cellule immunocompetenti: è ormai assodato che l'organismo reagisce contro l'insorgenza e la progressione di ogni tumore con l'immunosorveglianza cui sovrintendono cellule immunocompetenti effettrici (APC, linfociti T citotossici, cellule NK, ADCC) e meccanismi effettori umorali (anticorpi citotossici) (16 20 22).

- 4) Sede del tumore: quella ipofaringea è significativamente a prognosi peggiore.
- 5) Tempo di recidiva: tempi di recidiva brevi sono correlati con una peggiore sopravvivenza.

### *FATTORI PROGNOSTICI LEGATI ALLA TERAPIA*

#### **Fattori prognostici legati alla chirurgia**

Alcuni punti chiave sono:

- 1) L'importanza dell'orientamento del pezzo chirurgico.
- 2) Il problema della retrazione dei tessuti post fissazione.
- 3) Il problema della modalità di prelievo.
- 4) La definizione del concetto di “close margin”, per indicare un margine che, pur essendo negativo, è molto vicino al tumore.
- 5) L'importanza del tipo di positività del margine (avanzamento frontale o infiltrazione ).
- 6) L'importanza di un uso sistematico di diagnosi al congelatore in estemporanea.
- 7) Il «margine» sicuro cioè quello che appare negativo a 1,5-2 cm dal tumore.

#### **Fattori prognostici legati a Radioterapia e Radiochemioterapia**

Una serie di studi degli ultimi 20 anni ha permesso di razionalizzare, con discreta precisione le indicazioni alla Radioterapia e Radiochemioterapia, di perfezionare le tecnologie, le dosi radianti, i tipi di farmaci con relative dosi. E una serie di studi

clinici ha permesso di identificare ( in termini di risultati) l'associazione radio-chemioterapia. È chiaro che un'indicazione radio o radio-chemioterapia scorretta ed un'inadeguatezza di tecnica o di dose, porta ad un difettoso controllo locale e diventa pertanto un fattore prognostico negativo (24).

### **Ritardo terapeutico**

Si possono a questo punto ripetere le stesse considerazioni fatte a proposito del ritardo diagnostico.

## **FATTORI MOLECOLARI COINVOLTI NELLA PROGRESSIONE DEI CARCINOMI CERVICO-FACCIALI**

### *MODELLO MULTIFASICO DELLA PROGRESSIONE NEOPLASTICA DEI CARCINOMI CERVICO-FACCIALI*

I tumori sono malattie multigeniche, ossia malattie in cui lo sviluppo delle cellule neoplastiche è dovuto al progressivo accumulo di alterazioni multiple in geni cruciali per il mantenimento fisiologico della cellula nelle varie fasi della sua vita. I geni interessati sono in genere quelli coinvolti nei processi che controllano la proliferazione, il differenziamento, la senescenza e la posizione delle cellule nei tessuti e nel corpo. Le alterazioni geniche acquisite si accumulano nel tempo nelle cellule tumorali ed è necessario che un certo numero di lesioni (da tre a otto, secondo il tipo di tumore) si sommino per determinare la «progressione tumorale» ed il conseguente «fenotipo neoplastico». L'ordine con cui le lesioni si sommano non è casuale, poiché alcune alterazioni possono predisporre la cellula a subire più facilmente le alterazioni secondarie che la rendono cancerosa. È ormai noto che il processo di cancerogenesi è caratterizzato da almeno tre fasi. Le prime due fasi, rispettivamente di promozione e progressione, sono considerate fasi precliniche, in cui la malattia non è, conclamata e nelle quali si verificano alterazioni molecolari a carico di geni diversi che, al momento attuale, almeno per il carcinoma della testa e del collo, non sono ancora completamente conosciuti. La terza fase, definita di meta

statizzazione, rappresenta l'ultima tappa della progressione neoplastica in cui si «selezionano» solo quelle cellule, portatrici di alterazioni genetiche stabili, in grado di superare numerose barriere naturali e compiere una serie di tappe (distacco della massa cellulare di origine, ingresso in circolo, uscita dal circolo) che culminano nella formazione di un «clone metastatico» in microambiente diverso da quello normale. Anche per i carcinomi cervico-facciali è stato proposto un modello di progressione neoplastica multifasica (25) secondo il quale, ai diversi e ben definiti stadi clinici ed istopatologici attraverso cui la malattia evolve, corrisponderebbero lesioni genetiche caratteristiche: Mucosa iperplastica, Iperplasia benigna, Displasia, Carcinoma in situ, Carcinoma invasivo. Gli studi finora condotti hanno dimostrato la presenza di alcune specifiche alterazioni cromosomiche. Fra queste le più ricorrenti sono a carico dei loci 3p, 8p, 9p,11p, 13q e 17p, regioni ove sono localizzati oncogeni e geni onco-soppressori la cui «attivazione» o «perdita della funzione»e gioca un ruolo determinante nel processo tumorigenico e quindi nella prognosi della malattia.

### *ONCOGENI E GENI ONCO-SOPPRESSORI NELLA PATOGENESI DELLE NEOPLASIE*

Si definiscono oncogeni, quei geni, meglio noti come proto-oncogeni, che in condizioni fisiologiche sono deputati al controllo della proliferazione cellulare. Alterazioni strutturali, in seguito a mutazioni o riarrangiamenti cromosomici,

possono «attivare» uno o più proto-oncogeni. Il risultato di tale transizione (proto-oncogene-oncogene) è che l'oncogene, espresso in forma aberrante, codifica una proteina alterata. Tale proteina, alterata qualitativamente o quantitativamente, diventata insensibile ai meccanismi di retro-inibizione che controllano la proliferazione cellulare, trasmetterà il segnale proliferativo in modo sregolato. Secondo la localizzazione dei loro prodotti proteici, si distinguono quattro gruppi principali di oncogeni:

- Fattori di crescita,
- Recettori per i fattori di crescita,
- Messaggeri intracellulari,
- Fattori nucleari e di trascrizione,
- Soppressori di membrana, citoplasmatici e nucleari.

Il meccanismo di azione delle proteine codificate da queste famiglie di geni è noto solo in parte: essi agiscono con effetti di segno opposto negli eventi controllati dai fattori di crescita.

La trasformazione neoplastica può essere quindi definita come la conseguenza dell'alterato controllo proliferativo, per aumentata funzione di un regolatore positivo (oncogene) e/o perdita della funzione genica di un regolatore negativo (gene onco-soppressore) della proliferazione cellulare, i cui prodotti genici operano fuori controllo (fig.1).

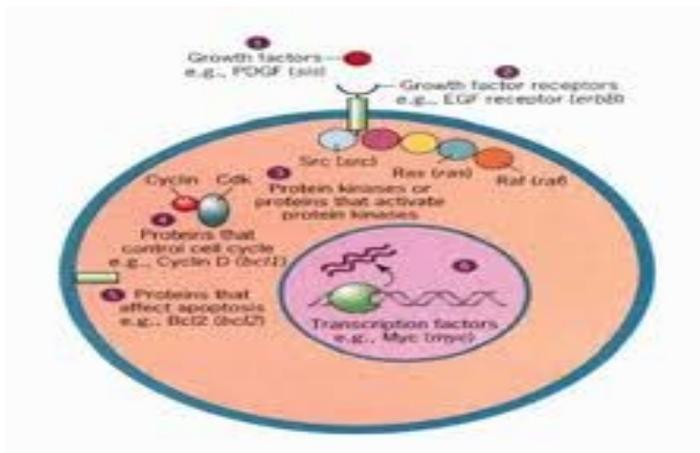


figura 1

Le transizioni da proto-oncogene ad oncogene e/o la perdita di funzione dei geni onco-soppressori, alla base dell'insorgenza dei tumori, sono da ricercarsi in fenomeni di instabilità genetica quali, amplificazioni geniche, alterazioni cromosomiche (strutturali o numeriche) e mutazioni puntiformi. L'amplificazione genica, cioè l'aumento del numero di copie di un determinato gene, con conseguente presenza di copie multiple del gene stesso e aumentata quantità del prodotto proteico codificato dal gene, è spesso riscontrata nei tumori umani ed è un meccanismo importante di attivazione dei proto-oncogeni (ERB-B, RAS, BCL-1), che conferisce alle cellule tumorali un vantaggio selettivo per la crescita.

Le principali «alterazioni cromosomiche strutturali» riscontrate nei tumori umani sono: delezioni, traslocazioni e inversioni. Tali alterazioni sono la conseguenza di rotture cromosomiche in uno o più punti del cromosoma. Le delezioni di frammenti cromosomici spesso risultano nella perdita di un gene oncosoppressore e conseguentemente della sua funzione di controllo della crescita cellulare.

Le traslocazioni e inversioni sono invece alterazioni strutturali che hanno come conseguenza l'alterata espressione qualitativa o quantitativa del prodotto dei proto oncogeni i quali, in seguito a inversioni, possono venire a trovarsi sotto il controllo di nuovi geni, oppure, in seguito a traslocazioni, danno luogo a geni di fusione che codificano proteine con alterata funzione biochimica.

Le anomalie cromosomiche numeriche implicano invece un cambiamento nel numero normale dei cromosomi, senza rotture cromosomiche. Il risultato è la perdita o l'acquisizione soltanto di alcuni cromosomi, cioè la presenza di copie in più o di una copia in meno di un omologo di uno specifico cromosoma rispetto ai due omologhi normali (aneuploidia). Le cellule cancerose spesso presentano un'aneuploidia estrema, con anomalie cromosomiche multiple. Le alterazioni a carico degli oncogeni sono generalmente definite di tipo «dominante»: cioè, gli oncogeni modificati, per struttura o numero, sono in grado di agire in singola copia ed il fenotipo neoplastico si afferma anche se l'alterazione si è verificata a carico di un solo allele. Al contrario, nel caso degli onco-soppressori, l'inattivazione genica che si esplica con la perdita di funzione è la conseguenza di un'alterazione strutturale che colpisce entrambi gli alleli ( in doppia dose ), definita di tipo «recessivo».

## *RUOLO DEGLI ONCOGENI E DEI GENI ONCO-SOPPRESSORI NEI MECCANISMI DI CONTROLLO DELLA CELLULA*

Il normale sviluppo fisiologico di una cellula è assicurato da meccanismi di controllo che si attivano durante alcune fasi della crescita e proliferazione cellulare. I punti di controllo più rilevanti nel ciclo di replicazione e differenziazione di una cellula sono:

- Ingresso in ciclo e divisione;
- Ingresso in fase G0 o quiescenza;
- Ingresso in fase differenziativa;
- Ingresso in apoptosi.

Alterazione geniche che si verificano a livello di una di questi punti di controllo della proliferazione portano ad uno squilibrio che ha come risultato il tipico scompenso proliferativo della cellula neoplastica. I fattori di crescita ed i recettori, con cui i fattori interagiscono, sono deputati al controllo dell'ingresso ed alla progressione delle cellule nel ciclo duplicativo. Tra i fattori di crescita, alcuni, reclutano le cellule quiescenti nel ciclo cellulare, facendole progredire dalla fase G0 (di quiescenza) alla fase G1 (di preparazione alla fase di sintesi del DNA o fase S); altri, più propriamente detti fattori di progressione, sono indispensabili per la transizione dalla fase G1 alla fase S. La funzione dei fattori di crescita si estende anche al controllo dei processi differenziativi. L'attività biologica dei fattori di crescita è mediata da recettori transmembrana ad attività tirosino-chinasi (Fig.2).

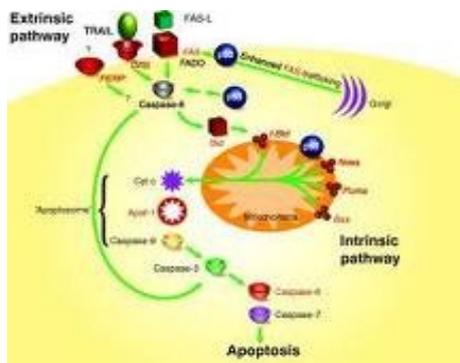


Figura 2

Tale attività si esplica in seguito al legame del recettore con il fattore di crescita che induce la dimerizzazione (unione di due molecole recettoriali normalmente presenti sulla membrana plasmatica in forma monocateneria) dei recettori presenti sulla membrana. Risultato della dimerizzazione è l'attivazione del processo di autofosforilazione del recettore stesso, su un residuo aminoacidico di tirosina, e di fosforilazione di substrati proteici citoplasmatici che, a loro volta attivati dalla fosforilazione, innescano una cascata di reazioni che trasmettono il segnale proliferativo e/o differenziativo al nucleo e culminano con l'induzione trascrizionale di nuovo geni. I geni che codificano per i fattori di crescita o per i loro recettori sono i proto-oncogeni, i quali, attivati da alterazioni genetiche strutturali, trasmettono il segnale proliferativo in modo sregolato.

**p53.** p53 è localizzato sul cromosoma 17p13 e rappresenta il gene più frequentemente studiato nei tumori. Il suo prodotto è la proteina p53, una fosfoproteina dal peso molecolare di 53 Kdalton, a localizzazione nucleare, che

interviene nei processi di controllo del ciclo cellulare a livello della fase G1-S e dell'apoptosi 10. Tale controllo si esplica grazie alle proprietà transattivanti della p53 che è in grado di legarsi direttamente al DNA e di regolare l'espressione di altri geni. La funzione principale della proteina p53 è quella di mantenere la stabilità genetica del DNA. In seguito ai danni al DNA essa si lega a specifici siti e ne dirige le risposte cellulari indirizzando la cellula verso l'arresto del ciclo in fase G1, con conseguente attivazione dei meccanismi di riparo (effetto immediato)<sup>26</sup>, o verso un programma di morte geneticamente determinato, definito apoptosi (effetto ritardato) (27) (fig.3).

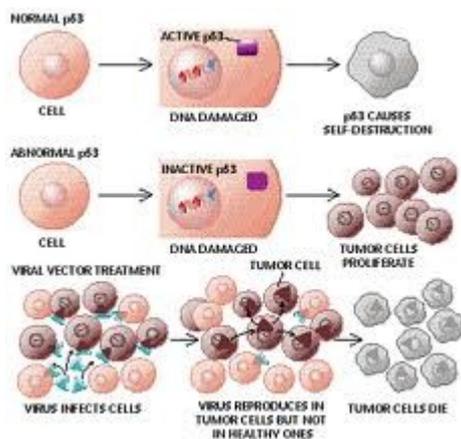


figura 3

Il legame della p53 ai siti di DNA danneggiato si basa sul riconoscimento di specifiche sequenze ed ha come effetto sia quello di proteggere la p53 dall'immediata proteolisi, con conseguente aumento della sua emivita, sia quello di attivare la trascrizione di numerosi altri geni (p21, MDM2, ciclina G, GADD45, BAX). In particolare, attivazione della trascrizione del gene p21,

attraverso la sua proteina impedisce, bloccando la fosforilazione di Rb ed il conseguente rilascio di E2F, la progressione nel ciclo nella fase G1 favorendo così la riparazione del DNA. Se la riparazione è produttiva, il ciclo cellulare riprende e la cellula sopravvive; se il danno è troppo esteso ed irreparabile, p53 promuove l'apoptosi della cellula. Per questa sua funzione il gene p53 è definito onco-soppressore e la ««perdita della sua funzione» in seguito ad alterazione geniche, quali mutazioni, porta alla crescita cellulare incontrollata contribuendo alla insorgenza dei tumori. Numerose sono le evidenze sperimentali che avvalorano l'azione oncosoppressiva di questo gene: in particolare l'espressione di una p53 normale è in grado di sopprimere o inibire la trasformazione di cellule in coltura da parte di oncogeni cellulari o virus (28), di bloccare la crescita di cellule trasformate (29) e di eliminare il potenziale neoplastico in cellule in vitro ed in vivo (30).

Mutazioni del gene p53 (p53M) nella linea germinale sono responsabili della «sindrome di Li-Fraumeni», rara patologia che predispone all'insorgenza di tumori di vario tipo; l'inattivazione della p53 in seguito a mutazioni o sequestro della proteina normale da parte di prodotti virali o della proteina mdm2, in grado di interferire con la normale funzione del gene, possono condurre alla trasformazione neoplastica della cellula e sono ritrovate con alta frequenza in molti tipi di tumori umani. In circa il 50% delle neoplasie umane è riscontrabile una p53M (31) e nel carcinoma della testa e del collo viene riportata un'incidenza tra il 10 ed il 75% dei casi (32 33). L'analisi dello status del gene onco-soppressore p53 si avvale sia di

metodiche molecolari che immunoistochimiche. Le tecniche molecolari, sono rivolte alla ricerca diretta di mutazioni nella sequenza nucleotidica del gene. Quelle immunoistochimiche, essendo in grado di identificare, mediante l'uso di anticorpi, il prodotto proteico del gene nelle cellule tumorali, che si evidenzia per avere un'emivita più lunga rispetto a quelle normali. L'analisi molecolare risulta da un lato il metodo più sensibile ed affidabile per lo studio di p53; dall'altro, la metodica è particolarmente impegnativa e costosa. Ciò fa sì che la maggior parte dei lavori riportino risultati incompleti in cui le analisi molecolari della sequenza nucleotidica del gene si focalizzano solo su alcuni esoni del gene, con il rischio di non identificare mutazioni che occorrono in altre regioni. Anche l'analisi immunoistochimica non è esente da critiche: infatti, non sempre mutazioni della p53 si accompagnano ad una sovraespressione della proteina oppure, la proteina alterata potrebbe essere prodotta in piccolissime quantità non rilevabili con l'immunoistochimica (falsi negativi). Al contrario, alti livelli proteici di p53 non sempre sono una conseguenza del gene ma, potrebbero essere dovuti ad un aumento della proteina come risposta cellulare ad un danno al DNA o ad una stabilizzazione della stessa da parte di fattori virali (falsi positivi). Infine, deve essere altresì sottolineato che con le tecniche immunoistochimiche si riscontrano molte variabilità di risultati legati alle differenti sensibilità dei molteplici anticorpi monoclonali in commercio, alle diverse metodiche di analisi e ai molteplici cut-off di conta utilizzati (34). p53 è il mediatore chiave della risposta cellulare al danno al DNA, nel senso che è

responsabile dei due possibili esiti del danno: se il danno è riparabile, induce l'arresto del ciclo cellulare in fase G1, mediante il controllo del gene p21, se il danno è più esteso promuove l'ingresso della cellula in apoptosi mediante la via del Bax/Bcl-2.

## **SIGNIFICATO CLINICO PROGNOSTICO DELLE ALTERAZIONI MOLECOLARI NEL CARCINOMA CERVICO-FACCIALE**

La sopravvivenza dei pazienti con carcinoma della testa e del collo, pur con il miglioramento delle tecniche chirurgiche, delle terapie complementari (radio e/o chemioterapia) e di protocolli integrati oggi a disposizione è rimasta sostanzialmente invariata negli ultimi 20 anni. È ancora arduo spiegarsi come alcune neoplasie a parità di sede e di stadio presentino un'evoluzione clinica tanto differente che ancora oggi non esistono elementi certi che indichino quale sia la prognosi per ogni singola neoplasia allo stesso stadio.

Alla luce di queste considerazioni si sono sviluppati studi di biologia molecolare allo scopo di ricercare nuovi indicatori, da affiancare a quelli tradizionali, capaci di rilevare sottogruppi di neoplasie con particolari caratteristiche evolutive e di apportare maggiori conoscenze sulle modalità di trasformazione delle cellule in senso neoplastico per permettere di attuare strategie terapeutiche preventive e mirate per ogni singola neoplasia in base ad un'esatta definizione delle sue caratteristiche biologiche. In tale contesto, nonostante siano ancora limitate le conoscenze sulle alterazioni molecolari alla base dell'induzione e della progressione maligna delle neoplasie, ruolo fondamentale assumono le alterazioni molecolari dei protooncogeni o l'inattivazione dei geni oncosoppressori coinvolti nei complessi meccanismi di

regolazione del ciclo cellulare e nelle varie fasi del processo di carcinogenesi del carcinoma squamo cellulare della testa e del collo.

**p53.** È il gene oncosoppressore più frequentemente studiato nel carcinoma della testa e del collo; numerosi studi della letteratura dimostrano come la perdita della normale funzione di p53, risultato di una mutazione o di un incremento della sua espressione, sia un evento estremamente comune in questo tipo di tumori. La PCR-SSCP ( polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism ) ha mostrato come le alterazioni siano più frequentemente rappresentate da delezioni e mutazioni a carico degli esoni 5-8, sebbene una piccola percentuale sia localizzata al di fuori di questa regione. Le mutazioni di p53 si associano frequentemente a sovraespressione della proteina che può essere in questa forma riscontrata con tecniche immunohistochimiche grazie all'incremento della sua emivita, altrimenti brevissima e come tale difficilmente evidenziabile.

I dati appaiono contrastanti nell'attribuire a questo gene, almeno per i carcinomi della testa e del collo, una rilevanza clinico-prognostica. Infatti, ad un'attenta analisi della letteratura, emerge un'assenza di correlazione significativa tra espressione della p53 ed i parametri clinico-patologici generalmente considerati. Ad oggi, la maggior parte degli autori ritiene che questo gene non possa essere considerato un attendibile parametro prognostico sia in termini di sopravvivenza globale che libera da malattia. Nella nostra ricerca condotta su 50 casi di carcinoma squamoso della laringe, è stato dimostrato un coinvolgimento di p53 (sovraespressione) nel 40,3%

dei casi; l'analisi multivariata non ha però mostrato significatività statistica sia per la sopravvivenza globale che libera da malattia, mentre è stata dimostrata per alcuni parametri clinici, quali la sede sovraglottica e le dimensioni del tumore. Comunque non si può trascurare quanto riportato da altri che invece dimostrano una correlazione statisticamente significativa per comparsa di recidive e sopravvivenza libera da malattia in pazienti con alterazioni di p53. Per quanto riguarda il coinvolgimento di diversi geni tra cui p53 nella radio/chemio sensibilità, i dati sono da attribuire a Lowe (1994) (44) ed a Kinzler (1994) (42) che dimostrano una correlazione tra mutazione del gene p53 e radio resistenza su linee tumorali in vitro e in alcuni sistemi sperimentali. I dati sul ruolo prognostico di p53 in pazienti affetti da carcinoma della testa e del collo trattati con radioterapia sono esigui e risultano contrastanti. Da un lato alcuni autori asseriscono che alterazioni di questo gene non influiscono sulla risposta ad un trattamento radio e/o chemioterapico. Altri invece gli conferiscono un significato prognostico. A questo riguardo si riporta come il controllo loco regionale e la comparsa di recidiva in pazienti trattati con radioterapia siano indipendentemente correlati alla mutazione di p53. In particolare Overgaard (1998) (47) e Raybaud-Diogene (1997) (49) riscontrano in pazienti con carcinoma della testa e del collo, che la comparsa di recidiva e/o la sopravvivenza globale sia indipendentemente correlata, oltre che con i parametri clinico-patologici, anche con la mutazione e la sovraespressione di p53; Warnakulasuryia (2000) (50) riporta una correlazione sia in analisi uni variata che multivariata tra p53 mutata e prognosi

infausta. Narayama (1998) 45 valutando l'espressione di p53 su 114 pazienti affetti da carcinoma squamocellulare della laringe in stadio iniziale (casi T1N0M0), trattati con radioterapia, riporta una correlazione statisticamente significativa tra sovra espressione di p53, riscontrata nell'82% dei casi, e recidiva loco regionale. Infine Koch (1996) 43 su 110 pazienti e Alsner (2001) 35 in due lavori con analisi di 114 e 58 pazienti con carcinoma della testa e del collo rilevano un rischio di recidiva loco regionale significativamente più alto per i pazienti con mutazioni di p53. A riguardo della ricerca di una possibile correlazione tra p53 e trattamento chemioterapico Cabelguenne (2000) (38) evidenzia alla analisi multivariata una correlazione significativa tra mutazione di p53 e mancata risposta terapeutica, e Osaki (2000) (46) riporta che il gruppo di pazienti con miglior prognosi mostrava un'espressione di p53 pari al 76,2% versus il 52,7% con una rilevanza statistica significativa. Infine Bradford (1999) (37) conferisce a questo gene, dopo analisi multivariata, un ruolo di marker prognostico predittivo per la selezione di pazienti da sottoporre dopo trattamento chemioterapico a una preservazione d'organo. Tali contrastanti risultati hanno contribuito a rendere ancora più nebulosa la comprensione della funzione di p53 e la sua correlazione con la prognosi. Alcuni dati sembrerebbero inoltre sostenere l'ipotesi che non tutte le mutazioni siano equivalenti e che, probabilmente, la detezione della mutazione non sia di per sé sufficiente alla definizione della prognosi, dato che le differenze in struttura e funzione delle diverse p53 mutate si

possono associare ad una prognosi infausta o ad una mancata risposta ad uno specifico trattamento.

Takes riporta come l'espressione di p53 non sia identica nelle tre maggiori sedi anatomiche del distretto testa-collo (laringe, faringe e cavo orale), ipotizzando quindi una possibile intrinseca variabilità «biologica» del carcinoma originatosi da sedi differenti tanto che l'autore conclude che non pare giustificabile analizzare insieme campioni di sede diversa. Ruolo clinico-prognostico degli anticorpi anti-p53 presenti nel siero di pazienti affetti da neoplasia della testa e del collo. La p53 mutata presente nelle cellule tumorali può essere rilasciata nel compartimento extracellulare e da qui assorbita in circolo: il suo livello sierico si è riscontrato aumentato in diversi tumori umani ed è stata anche osservata una buona correlazione tra la presenza di autoanticorpi anti p53 e l'accumulo e/o la mutazione di p53 nel tumore. Il meccanismo alla base della produzione di autoanticorpi anti-p53 non è attualmente noto: si ipotizza che si inneschi una risposta da parte del sistema immunitario verso questa nucleoproteina che risulta alterata e comunque generalmente non presente in circolo. Dall'analisi della letteratura emergono dati contrastanti sul valore clinico-prognostico degli anticorpi anti-p53, anche se consistenti risultati si sono evidenziati per il carcinoma della mammella, dello stomaco e del colon. In particolare nel carcinoma della mammella è stato possibile dimostrare un reincremento di Ab anti-p53 a distanza di due anni dall'intervento chirurgico e tre mesi prima della manifestazione di una recidiva tanto che si ipotizza

che questo riscontro in alcuni tipi di tumore potrebbe essere un utile ed ulteriore parametro da affiancare a quelli tradizionali per il controllo della risposta alla terapia e per sospettare precocemente una recidiva clinicamente non manifesta. A supporto di questo è importante sottolineare come, nel follow up di pazienti con questo istotipo tumorale, sieronegativi al momento della diagnosi, non siano riscontrabili nel siero anticorpi anti-p53. Inoltre deve essere sottolineato che si sono evidenziati nel siero di individui a rischio per esposizioni a sostanze tossiche o per abuso di sostanze voluttuarie la presenza di alti livelli di Ab anti-p53, in particolare in pazienti con esofagite di Barrett ed in pazienti con leucoplachie del cavo orale tanto che si è ipotizzato che questi anticorpi possano essere utilizzati per poter individuare lesioni precancerose a forte rischio di degenerazione carcinomatosa. Per quanto riguarda il distretto cervico-facciale i dati riportati invece sono particolarmente esigui e contrastanti. Chow (2001) (41) e Gottschlich (2000) (48) rilevano la presenza di anticorpi anti-p53 non solo nel siero di pazienti con neoplasia della testa e del collo (frequenza del 20-30%) dei casi ma anche, seppur in una percentuale più piccola, in pazienti appartenenti al gruppo di controllo, tanto che Chow conclude che al momento attuale la loro presenza non può essere di per sé diagnostica di tumore né tantomeno può essere utilizzata come screening di popolazioni a rischio. Similmente, anche il valore prognostico di tali anticorpi è controverso. Da una parte Bourhis (1996) (36) riporta una correlazione tra prognosi infausta e presenza nel siero di anti-p53, dall'altro Chow (2001) (39) dimostra che alti livelli sierici

preoperatori di anti-p53 di 75 pazienti con tumore del distretto cervico-facciale si associano significativamente con una maggior frequenza di metastasi linfonodali senza riportare alcuna correlazione significativa tra presenza preoperatoria di anticorpi anti p-53 e sopravvivenza globale e libera da malattia, in linea con quanto riportato da Gottschlich (2000) (40) su una casistica di 109 carcinomi della testa e del collo.

Alla luce di queste considerazioni appare evidente che ancor oggi non è possibile attribuire, per il carcinoma della testa e del collo, alla presenza nel siero di anticorpi anti-p53 un sicuro e attendibile significato prognostico.

**Gene p53.** L'osservazione del coinvolgimento del gene p53 nell'arresto del ciclo cellulare in fase G1-S e nell'innescò dell'apoptosi, ha suggerito, un suo ruolo nella custodia dell'integrità genomica. Questo gene è attivamente coinvolto nei complessi meccanismi di morte cellulare programmata quando l'entità del danno non permette la riparazione del DNA. Tali fenomeni possono però essere sostenuti da altri geni proapoptotici quale bax, che è capace di promuovere la morte cellulare (14) e contrastati dall'azione «inibitoria» di oncogeni quali bcl-2, gene capace di inibire l'apoptosi indotta da radioterapia e/o da agenti chemioterapici. Diverse evidenze in letteratura dimostrano che lo status del gene p53 può influenzare e modulare la risposta cellulare al trattamento radioterapico che trova la sua modalità di azione nella induzione di apoptosi: si riporta che la trasfezione mediata da adenovirus di

p53 WT in linee umane cellulari con delezione omozigote di p53 determini un significativo incremento della loro sensibilità ad agenti chemioterapici. Il riscontro di sovraespressione di p53 dopo trattamento con agenti antineoplastici suggerisce un suo ruolo modulatore nella risposta cellulare a queste terapie.

La maggior parte degli autori concordano nel conferire una prognosi peggiore ai pazienti portatori di carcinomi squamocellulari della testa e del collo con alterazioni del gene p53 trattati con radioterapia sia in termini di precoce comparsa di recidive loco regionali che di sopravvivenza a lungo termine. In particolare Koch et al. (1996) riportano su 110 pazienti affetti da carcinoma della testa e del collo trattati con radioterapia una mutazione di p53 nel 44% dei casi; e in questo sottogruppo di pazienti un aumentato rischio di recidiva loco regionale statisticamente significativa, Ganly et al. (2000) rilevano nel 95% di pazienti affetti da recidiva di carcinoma della testa e del collo trattata con radioterapia una mutazione di p53, Alsner (2001) in 114 carcinomi della testa e del collo trattati con radioterapia e , in parte, anche con chirurgia riporta come la sopravvivenza globale e la comparsa di recidive siano rispettivamente ridotte al 13% versus 38% ed al 29% versus il 54% nei pazienti con p53 mutata. Ravi et al. (2001) riportano in casi di carcinoma del cavo orale come il rischio di recidive loco regionali risulti raddoppiato nei casi che presentavano una alterazione del gene p53. Cabelguenne (2000) evidenzia la presenza di mutazioni di p53 in tumori non responsivi al trattamento attribuendo allo status di questo gene valore predittivo per la risposta alla terapia l'integrità del gene p53 e la risposta alla

terapia antineoplastica, o addirittura rilevano una relazione inversa, sostenendo che i tumori p53 mutati siano caratterizzati da una prognosi migliore. In particolare, Gasparini (1995) osserva che la sopravvivenza libera da malattia tra i 73 pazienti affetti da carcinoma della testa e del collo in stadio avanzato osservati e sottoposti a trattamento chemio-radioterapico, risulta significativamente maggiore nei casi con p53 mutata ed in casistiche ancor più limitate.

Per concludere, la maggior parte degli studi dimostrano che alterazioni di p53 si correlano con una minore radiosensibilità e peggiore prognosi. Le dicotomie nei risultati riportati in letteratura paiono ascrivibili in prima ipotesi alle differenze metodologiche applicate, ai cut-off usati per definire l'espressione del gene ed anche alle casistiche oggetto di studio. L'approccio chirurgico risulta il principale trattamento per il carcinoma squamocellulare della testa e del collo. Il più importante fattore prognostico è rappresentato dall'attuazione di una radicalità oncologica dal momento che la mancata eradicazione della malattia costituisce la principale causa di morte nella stragrande maggioranza dei pazienti affetti da carcinomi del distretto testa-collo. Una recidiva loco-regionale nel corso del follow-up rappresenta, infatti, un evento non infrequente (poco meno del 50% dei casi) e condiziona in maniera fortemente negativa la prognosi della malattia. I dati della letteratura indicano inoltre come in un certo numero di casi tali recidive si verificano anche in pazienti con forme relativamente iniziali e nei quali la resezione chirurgica è stata condotta con criteri di radicalità, accertati dall'esame istologico dei margini di sezione e dei

linfonodi laterocervicali asportati spesso a scopo precauzionale. Tale dato, al di là di potenziali errori di campionamento e della limitata sensibilità delle tecniche di routine nella valutazione istopatologica dei campioni ottenuti dal pezzo operatorio, evidenzia i limiti del solo esame istopatologico nella determinazione della radicalità chirurgica, non escludendo pertanto in maniera assoluta la possibilità che cellule maligne possano essere residue nell'ospite, con un'elevata possibilità di determinare la temuta ripresa di malattia.

Alla luce di queste considerazioni si ritiene necessario una più precisa ed accurata valutazione del paziente affetto da carcinoma della testa e del collo per ridurre al minimo dopo chirurgia il rischio sia di «minimal residual disease» che di multipli tumori a carico delle vie aeree digestive.

È giusto distinguere due concetti importanti che si riferiscono agli indicatori molecolari; gli indicatori molecolari di rischio sono quelle alterazioni genetiche che sono maggiormente riscontrabili in una popolazione esposta ad un determinato fattore rispetto alla popolazione generale non esposta (fumo, consumo di alcool, età, sesso, predisposizione genetica); gli indicatori molecolari prognostici sono quelle alterazioni molecolari riscontrabili negli stadi più avanzati della malattia che rappresentano un indice di maggiore malignità, in termini di aggressività biologica del tumore, e forniscono al clinico informazioni sull'evoluzione clinica della malattia e sulla sopravvivenza.

Da ciò si evince che il significato di ciascun indicatore varia a seconda che questi appartengano ad una o all'altra categoria. Tale suddivisione in categorie si basa sull'osservazione che la cancerogenesi è un processo multifasico in cui si accumulano in modo sequenziale alterazioni genetiche in geni cruciali per il controllo della proliferazione cellulare (52-53). Tali alterazioni avvengono in genere in oncogeni e geni onco-soppressori, geni che controllano, in condizioni fisiologiche, le normali funzioni di una cellula.

Ed è proprio l'attenta analisi delle lesioni genetiche specifiche che si avverano nella cellula durante i vari «stadi» del processo di cancerogenesi, che ha portato all'identificazione ed alla definizione delle diverse categorie di marcatori molecolari, specifici di ciascuna fase della progressione neoplastica o di ciascuna neoplasia.

Sulla base di tale premessa potremmo allora cercare di semplificare il significato di indicatore molecolare dicendo che ciascuna cellula tumorale, destinata poi ad espandersi in maniera clonale, porta con sé delle alterazioni genetiche che possono essere utilizzate come «markers molecolari» di rischio, prognosi, diagnosi o predittivi. Potremmo inoltre aggiungere che, se l'alterazione molecolare è specifica della cellula tumorale e si avvera in uno stadio specifico del processo di cancerogenesi allora, l'indicatore viene definito tumore-specifico. Di qui l'ulteriore distinzione tra indicatori tumore-specifici ed indicatori tessuto-specifici.

Gli indicatori tumore-specifici sono indicativi di alterazioni genetiche specifiche osservate nei tumori (mutazioni o riarrangiamenti cromosomici).

Gli indicatori tessuto-specifici sono marcatori specifici del tessuto da cui il tumore deriva in quanto espressi in modo omogeneo nel tumore derivato da un determinato tessuto e normalmente non espressi nel campione clinico in esame (es. le citocheratine utilizzate come marcatori epiteliali in tessuto linfonodale).

Oltre ai problemi legati alla terminologia ed alla definizione delle diverse categorie di indicatori molecolari andrebbero definiti anche dei criteri in base ai quali un indicatore molecolare possa essere considerato «attendibile».

Facendo riferimento al lavoro di Brennan e Sidransky (1996) (51), affinché un marker sia attendibile dovrebbe rispondere ad alcuni requisiti essenziali:

- Dovrebbe essere specifico per le cellule tumorali, tale da poter distinguere chiaramente le cellule normali da quelle tumorali;
- Se si tratta di un marker indicatore della clonalità del tumore, dovrebbe individuare quelle alterazioni geniche indicative della fase di transizione da «displasia» e «carcinoma in situ» a «carcinoma invasivo». Le alterazioni identificate nello stadio di «carcinoma invasivo» dovrebbero essere sempre osservabili sia nelle cellule tumorali che in quelle metastatiche;
- Dovrebbe essere applicabile a gran parte della popolazione in studio.

Al momento, per i tumori del distretto cervico-facciale, nessuno dei fattori molecolari alterati nelle varie fasi del processo di cancerogenesi, è routinariamente utilizzato come marker prognostico, diagnostico o predittivo nella pratica clinica. Come si evince dall'analisi dei risultati riportati in letteratura, alcuni fattori

considerati generalmente indicativi di prognosi severa o di rischio (es.p53) in realtà hanno una significatività minore rispetto a quanto generalmente ritenuto e non sempre omogenea tra i vari autori.

Tali fattori meriterebbero quindi di essere studiati su casistiche più numerose ed omogenee. Gli stessi Autori asseriscono che lo studio della significatività della p53 nei tumori umani può essere considerato, al momento attuale, di fase I, essendo stata dimostrata un'associazione significativa soltanto nei tumori del polmone, nei linfomi non-Hodgkin's ed in quelli della mammella. Per i tumori del distretto cervico-facciale potremmo allo stato attuale definire, l'analisi dell'espressione della p53, della ciclina D1, le alterazioni cromosomiche del cromosoma 11q13, la sovra espressione di ErB-1 o EGF-R e di ErB-2 e le molecole di adesione, per ora solo dei fattori prognostici «sperimentali» e quindi solo potenziali marker prognostici che meritano di essere validati su casistiche di dimensioni adeguate ed omogenee. Negli ultimi anni, a completamento della diagnostica istomorfologica ( istologia, conteggio e valutazione dei linfonodi positivi, volume tumorale, profondità dell'infiltrazione, grading...) si sono sviluppate nuove tecniche, istochimiche e molecolari che permettono di analizzare l'eventuale alterata espressione di molecole di probabile significato prognostico.

Le tecniche istochimiche attualmente più utilizzate per l'identificazione di fattori prognostici sono:

- immunohistochemical: evaluation *in situ* of protein expression by the use of specific antibodies;
- in situ hybridization: evaluation *in situ* of the presence of nucleic acids, associated with tumor transformation, by using complementary oligonucleotide sequences to the target gene sequence;
- FISH: chromosomal analysis based on the technique of in situ hybridization with a fluorescent detection method.

Tra le tecniche molecolari, l'avvento della tecnologia di PCR o Polymerase Chain Reaction (reaction of polymerization in a chain), for the enzymatic amplification of DNA, has opened the way for the use of direct analysis of the information contained in nucleic acids as an investigative method in biological research.

PCR is a technique of gene amplification that exploits the capacity of an enzyme, DNA polymerase, to synthesize *in vitro* up to 10<sup>9</sup> copies of any specific DNA segment. One of the fundamental aspects of the PCR reaction is the enormous amplification power of the target gene sequences, indispensable for the subsequent application of any of the techniques of molecular biology.

Notwithstanding the limits to its use, represented above all by the risk of contamination of the sample from exogenous material, or, in the case

di tessuti tumorali, da parte di cellule normali, la PCR ha raggiunto un ottimo livello di affidabilità.

L'analisi di PCR in clinica viene utilizzata per:

- Diagnosi precoce (precedente ad una definita alterazione istologica)
- Prognosi
- Predittività di risposta terapeutica
- Monitoraggio del paziente.

## **POSSIBILE APPORTO DELL'ANALISI MOLECOLARE NELLO STAGING DEL CARCINOMA CERVICO-FACCIALE**

Il principio fondamentale della chirurgia oncologica per ottenere il controllo locale del carcinoma della testa e del collo è un'asportazione completa e con margini adeguati che devono essere più o meno estesi a seconda della sede iniziale della neoplasia poiché, la mancata eradicazione della malattia, costituisce la principale causa di morte nella stragrande maggioranza dei pazienti affetti da carcinomi della testa e del collo 10. Una recidiva loco regionale rappresenta un evento non infrequente e condiziona in maniera fortemente negativa la prognosi, indipendentemente dalla sede di ripresa della malattia.

I risultati riportati in letteratura appaiono spesso non significativi e contrastanti: accanto a dati che evidenziano come la percentuale di recidive sia nettamente più alta in pazienti con margini di resezione positivi, si affiancano ulteriori osservazioni che dimostrano come la ripresa di malattia possa essere riferibile ad una non corretta manipolazione del pezzo operatorio, a potenziali errori di campionamento, alla limitata sensibilità delle tecniche istopatologiche routinarie ma anche alla possibilità che cellule maligne possano essere residue nell'ospite.

Così, come per le aree di mucosa circostanti il tumore, anche per le stazioni linfatiche possono non essere riscontrabili, alle indagini routinarie, cellule neoplastiche con il rischio di diminuire del 50% la sopravvivenza per un più alto

numero di metastasi linfonodali (N+) e a distanza (M+). Alla luce di questi dati, ancora oggi, la maggior parte degli autori appare favorevole ad attuare una chirurgia elettiva sulle stazioni linfatiche, pur con tecniche più selettive.

Occorre poi considerare che circa il 10-30% dei pazienti con carcinoma della testa e del collo manifesta un secondo tumore sincrono o metacrono in aree differenti delle VADS. A tale riguardo diversi studi sembrano definire come plurime localizzazioni siano geneticamente identiche tra loro e si sviluppino per l'innescarsi di eventi genetici multipli in grado di determinare subcloni cellulari con marcata capacità di crescita e di proliferazione rilevabili unicamente con tecniche molecolari. Alla luce di queste considerazioni, poiché i parametri clinico patologici generalmente considerati di per sé risultano ancora inadeguati, in quanto pazienti con neoplasie allo stesso stadio e sede, sottoposti ad uguali trattamenti possono presentare una evoluzione completamente differente, si sono sviluppate linee di ricerche genetiche e di biologia molecolare mirate ad identificare sia pazienti con un'aumentata suscettibilità genetica, sia tumori ad uno stadio preclinico non ancora clinicamente manifesti. Analisi recenti sulla progressione tumorale hanno focalizzato l'attenzione sull'impiego sempre più frequente di tecniche molecolari capaci di identificare in campioni biologici di diversa natura, tra cui margini di sezione e linfonodi, «cellule clonali», cioè con alterazioni del DNA analoghe a quelle del tumore primitivo aprendo così la strada ad una stadiazione molecolare della neoplasia stessa. Dati preliminari di Gallo et al. (2000), suggeriscono la possibilità che l'uso della

stadiazione e dell'analisi molecolare dei margini di resezione chirurgica possa consentire l'identificazione di una minimal residual disease (MRD) non altrimenti riconoscibile alle indagini istopatologiche comunemente utilizzate, basata sulla identificazione di cellule genotipicamente correlate con il tumore primitivo e non necessariamente modificate fenotipicamente al punto da non essere riconoscibili facilmente come maligne. L'analisi molecolare è basata sull'identificazione di cellule genotipicamente correlate con il tumore primitivo ma non necessariamente modificate fenotipicamente a tal punto da non essere facilmente riconoscibili come maligne. Essa si focalizza sull'analisi dei *microsatelliti*, una classe di elementi genetici altamente polimorfi ed instabili, abbondanti nel genoma umano e distribuiti equamente tra le sequenze geniche. I microsatelliti sono porzioni di DNA di lunghezza variabile, tra 100 e 400 nucleotidi, costituiti da ripetizioni in tandem di due, tre e quattro nucleotidi. La letteratura riporta che in diversi tipi di tumori solidi, incluso il carcinoma della testa e del collo, in uno stesso individuo il DNA estratto da cellule tumorali può differire dal DNA derivato da tessuto sano per la presenza di alterazioni nelle sequenze ripetitive dei microsatelliti. Le alterazioni possono essere costituite da una delezione o amplificazione all'interno della sequenza ripetuta del microsatellite atta a generare un nuovo allele che caratterizza la popolazione tumorale oppure, in individui che presentano eterozigotà nella regione del microsatellite, dalla presenza di un solo allele per una completa delezione del microsatellite su un allele (perdita di eterozigotà). Alla luce di quanto detto,

L'alterazione di un microsatellite può rappresentare un vero e proprio marcatore molecolare delle cellule tumorali. I microsatelliti sono particolarmente adatti a svolgere un ruolo di markers molecolari per la loro abbondanza e distribuzione in tutto il genoma umano, perché sono ipervariabili e, non ultimo, sono facilmente analizzabili con tecniche molecolari di amplificazione in PCR (polymerase chain reaction). Per quanto riguarda la scelta dei microsatelliti da analizzare, è importante prendere in esame molteplici marcatori che mappino in loci diversi del genoma umano e rappresentino regioni di potenziale interesse nella carcinogenesi per le neoplasie a partenza dalla testa e collo.

L'analisi dei microsatelliti comporta due fasi:

a) il primo obiettivo è rispondere alla domanda «il marcatore è informativo?» In altre parole, solo se il pattern di amplificazione del microsatellite nel tumore è diverso rispetto al tessuto sano, è possibile identificare l'eventuale presenza di una popolazione clonale derivata dal tumore.

b) nei casi in cui il microsatellite in esame è informativo, si procede all'analisi dei margini di resezione e/o dei linfonodi; il pattern di amplificazione dei microsatelliti in questi tessuti confrontato con il pattern dato dal tessuto sano e tumorale, consente di verificare l'eventuale presenza di cloni tumorali.

## MATERIALI E METODI

La ricerca condotta ha interessato 25 pazienti affetti da carcinoma cervico-facciale e specificamente:

- 18 carcinomi laringei,
- 5 carcinomi rinofaringei,
- 2 carcinomi della lingua.

I pazienti, 20 uomini e 5 donne, avevano un'età media di 58 anni (min.32, max. 75).

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad una batteria di esami strumentali per la diagnosi di pertinenza:

- prelievo ematico di routine,
- rinofibrolaringoscopia,
- TC, RMN,
- biopsia della stazione interessata.

Oltre a questi esami, è stata eseguita l'analisi molecolare sul siero dei pazienti, secondo diverse fasi, per la ricerca della proteina p53 e della concentrazione di anticorpi anti-p53. Dopo l'effettuazione del pertinente intervento chirurgico, di exeresi della massa tumorale e di eventuali linfonodi metastatici, è stato predisposto un follow-up della durata di 24 mesi, con cadenza trimestrale per il primo anno e semestrale successivamente.

Le fasi dell'analisi molecolare erano costituite da :

- raccolta dei campioni: materiale cellulare derivato dal tumore primario e campione di tessuto sano (il loro confronto ci ha permesso di valutare l'informatività dei microsatelliti e scegliere quali utilizzare come markers molecolari).
- Estrazione del DNA dai campioni biologici. L'alta sensibilità delle tecniche utilizzate, ci ha permesso di condurre l'analisi anche su quantità scarse di materiale e su DNA a basso peso molecolare o parzialmente degradato nei casi di difficile raccolta del campione.
- Amplificazione del DNA del microsatellite tramite PCR. I microsatelliti sono regioni di DNA di lunghezza variabile tra 100 e 400 nucleotidi, ciò a vantaggio dell'efficienza di amplificazione e della possibilità di amplificare DNA parzialmente degradato. Per l'amplificazione viene utilizzata una coppia di primers fiancheggiante la regione del microsatellite. In questa fase è fondamentale ottimizzare le condizioni di PCR al fine di ridurre le bande di amplificazione aspecifiche che renderebbero difficoltosa l'interpretazione dei risultati.
- Separazione degli amplificati in gel elettroforesi. Trattasi di un gel elettroforesi ad alta risoluzione perché deve consentire la discriminazione di bande di amplificazione del DNA che differiscono di un solo nucleotide. A questo scopo la separazione è stata effettuata su gel di grandi dimensioni di acrilamide/bis acrilamide (19:1) concentrata al 10 %. Per la rivelazione delle

bande di amplificazione del DNA che prevede la precipitazione di Sali di nitrato d'argento. A fianco di una elevata sensibilità di rilevazione, questa colorazione presenta il vantaggio della non tossicità dei reagenti da utilizzare.

- Interpretazione dei dati. La difficoltà di questa fase dell'analisi può essere aumentata dalla complessità dei pattern di amplificazione presentati dai campioni. Bisogna inoltre considerare la possibilità contaminazione del tessuto tumorale con il tessuto sano circostante.

## RISULTATI

La necessità di unire alla diagnosi di neoplasia, il maggior numero di informazioni sulla sua possibile evoluzione e prognosi, è oggi una delle esigenze più sentite in oncologia. Ancora oggi, i parametri clinico-patologici generalmente considerati non consentono una completa definizione del processo neoplastico e non sembrano essere attendibili dal punto di vista prognostico, dal momento che, molto spesso, neoplasie allo stesso stadio presentano evoluzioni cliniche differenti ed imprevedibili. Si sono sviluppate pertanto, negli ultimi anni, ricerche molecolari volte alla comprensione dei complessi meccanismi associati alla trasformazione e alla progressione neoplastica con l'intento di cercare di migliorare l'accuratezza diagnostica e meglio definire l'evoluzione prognostica di ogni singola neoplasia. In aggiunta a ciò, le tecniche di analisi molecolare oltre che caratterizzare sul piano biologico la neoplasia, potrebbero fornire uno strumento utile sia nell'individuazione di pazienti a maggior rischio di sviluppo di una neoplasia ( per suscettibilità intrinseca o per l'esposizione a fattori di rischio), sia nella selezione di pazienti da sottoporre a trattamenti terapeutici differenti, sulla base della caratterizzazione molecolare di ogni singola neoplasia.

Emergono quindi due sostanziali punti di applicabilità clinica dei marcatori molecolari: uno essenzialmente diagnostico e l'altro mirato alla selezione di tumori maggiormente aggressivi. Il primo si prefigge, attraverso l'individuazione di

alterazioni molecolari, di ricercare aree di mucosa istologicamente sana ma a fortissimo rischio per la presenza di queste alterazioni di degenerazione neoplastica e di individuare residui minimi di malattia, quali quelli ad esempio a livello dei margini chirurgici di resezione e recidive loco regionali e/o a distanza. Il secondo punto mira invece a meglio caratterizzare, dal punto di vista molecolare, i pazienti, per cercare di determinare l'aggressività della forma neoplastica attraverso l'individuazione di alterazioni molecolari a carico di specifici geni che stimolano o inibiscono la proliferazione cellulare per poter meglio guidare le scelte terapeutiche oggi a nostra disposizione.

La ricerca di ulteriori indicatori prognostici, peculiari e specifici per ogni singola neoplasia e per ogni singolo caso, nasce dalla necessità di predisporre un trattamento specifico che offra il migliore beneficio terapeutico per quel singolo paziente. Alla luce di queste considerazioni si desume come sia importante risalire alle alterazioni genetiche alla base di un'aumentata predisposizione allo sviluppo della neoplasia; identificare situazioni preneoplastiche in pazienti esposti a fattori di rischio e, per ultimo, cercare di caratterizzare la lesione neoplastica possibilmente per predirne l'evoluzione clinica e precisarne le caratteristiche di chemio/radiosensibilità al fine di poter poi impostare la più corretta strategia terapeutica.

Attualmente non sembrano esistere indicatori molecolari ideali che, oltre a dare informazioni prognostiche affidabili sull'evoluzione di ogni singola neoplasia siano

anche di facile esecuzione e poco costosi e ciò fa sì che il clinico routinariamente e generalmente si avvalga dei soli parametri clinico patologici tradizionali.

Dei nostri pazienti: 6 presentavano alti livelli sierici preoperatori di anticorpi anti-p53 (24%) ed al primo follow-up, dopo tre mesi solo in uno di questi (16,7%) si è riscontrato un aumento della concentrazione di anticorpi anti-p53 sierica. Una percentuale troppo bassa per ritenerla significativa. Lo stesso paziente, dopo 9 mesi dall'intervento presentava metastasi linfonodale. Nei restanti 5 pazienti non c'è stata nessuna variazione dei livelli sierici di anticorpi anti-p53 e quindi, in definitiva nessuna correlazione significativa tra presenza preoperatoria di anti-p53 e sopravvivenza globale e libera da malattia.

In linea con gli studi di Gottschlich e Chow, appare evidente che, anche per noi, non è stato possibile attribuire, alla presenza di anticorpi anti p-53, un sicuro ed attendibile significato prognostico.

## CONCLUSIONI

Alla luce di queste considerazioni e dai dati della letteratura, lo scopo della ricerca è quello di attuare uno studio molecolare dei linfonodi e dei margini di resezione classificati come negativi all'esame istopatologico per meglio definire il concetto di radicalità oncologica e di re-stadiare la neoplasia in accordo con i dati molecolari. Questo approccio potrebbe consentire di identificare cellule pre- o francamente neoplastiche (con alterazioni del genoma compatibili con quelle del tumore primitivo) in margini di sezione indenni e micrometastasi linfonodali non altrimenti riscontrabili alle indagini istopatologiche routinarie. L'analisi dei microsatelliti permette:

1. una più appropriata stadiazione molecolare della neoplasia: in particolare a livelli linfonodale attraverso il riscontro di cellule tumorali in linfonodi istologicamente negativi alle indagini routinarie (pN0) o per un riscontro di ulteriori linfonodi metastatici in pazienti pN+.
2. il riscontro di cellule tumorali in margini di resezione chirurgica istologicamente negativi e la dimostrazione di un incremento del rischio di recidiva locale dopo chirurgia potrebbe suggerire di pianificare differenti strategie terapeutiche comprendenti un reintervento con escissione di tessuto addizionale o una radioterapia adiuvante dopo chirurgia in quei pazienti con

alterazioni di microsatelliti in aree di mucosa apparentemente e istologicamente libere dal tumore.

3. il riscontro nelle vie aeree digestive di differenti aree di popolazioni cellulari con le stesse alterazioni genetiche del tumore primitivo potrebbe avere un significato biologico ed implicazioni cliniche.

Il beneficio clinico della diagnostica molecolare sarebbe quindi rappresentato da un trattamento iniziale e da un eventuale trattamento di recupero più precoce e pertanto generalmente più efficace, una maggiore sicurezza di radicalità con un eventuale ampliamento dei margini di resezione ed eventuale associazione di terapie complementari.

Un'attivazione di p53 nel carcinoma della testa e del collo attraverso analisi immunohistochimiche e molecolari, è stata dimostrata in circa il 50-80% dei casi. Alterazioni del gene p53 sono riscontrabili in aree di mucosa displastica e mucosa normale adiacenti al tumore, tanto che si ritiene che p53 possa essere coinvolto nelle fasi precoci del processo di carcinogenesi. La maggior parte dei dati riportati, in particolare per il carcinoma squamocellulare della laringe, evidenziano che non esiste nessuna correlazione statisticamente significativa tra p53 e le variabili clinico patologiche generalmente considerate. Alla luce dei dati attuali il gene oncosoppressore p53 e l'anticorpo p53 non può essere considerato per il carcinoma della testa e del collo un fattore prognostico indipendente in quanto al momento

della diagnosi questo gene non fornisce con assoluta certezza informazioni sulla evoluzione clinica sia in termini di sopravvivenza libera da malattia che globale.

L'impossibilità di conferire un valore prognostico a questo gene deve essere anche riferita alla mancanza di una chiara, definita e standardizzata valutazione, alla eterogeneità delle casistiche che comprendono spesso tumori a partenza da differenti sedi, a stadio diverso, ed analizzate con differenti metodiche, responsabili in ultima analisi dei risultati spesso contrastanti e discordanti tra loro. Infatti, i fattori che generalmente influenzano questi studi includono un non adeguato reclutamento dei pazienti e sono caratterizzati da problemi di ordine metodologico, tanto che oggi studi statistici meta-analitici indicano che solo per il carcinoma del polmone, della mammella e per i linfomi non Hodgkin si possa conferire a p53 un significato prognostico.

La conflittualità dei dati riportati potrebbe essere ascritta per questo gene anche al fatto che alcuni studi per diverse neoplasie, tra cui i carcinomi della testa e del collo, conferiscono a specifiche mutazioni di p53 un differente ruolo prognostico. Si riporta che pazienti con neoplasia della testa e del collo con una mutazione specifica erano caratterizzati da una sopravvivenza ridotta o ad una scarsa risposta terapeutica rispetto ai pazienti con p53 normale.

Diverse evidenze in letteratura dimostrano che questo gene può influenzare e modulare la risposta cellulare al trattamento radio-chemioterapico tanto che da un lato sono stati dimostrati i potenziali effetti radio sensibilizzanti di una p53 normale

(p53wild type), dall'altro è riportato che il riscontro di mutazioni di p53 (p53M) impedisce alle cellule sottoposte a radio e/o chemioterapia di andare in apoptosi.

## **Bibliografia**

- 1 Franceschi S., Barzan L., Talamini R. Screening for cancer of the head and neck: if not now, when? *Oral. Oncol.*, 33: 313-316, 1997.
- 2 Bellioni P, Artuso A, Camaioni A. Storia naturale e diagnostica clinica. In: I tumori della lingua e del pavimento orale. Aspetti clinici e terapeutici. Bristol: Medical avances 1987:12-24.
- 3 Cortesina G. Altre osservazioni critiche sulla classificazione TNM dei tumori maligni cervico-cefalici. Riunione di Aggiornamento LXXV Congr Nazion SIO *Acta Otorhinol Ital* 1988;8:312-70.
- 4 Cortesina G. Storia naturale dei carcinomi della testa e del collo. In: I carcinomi del distretto cervico-cefalico. Diagnosi e terapia. Torino 1990: 19-23.
- 5 Karim AB, Kralendonk JH, Njo KH, Tabak JM, Gort G. A critical look at the TNM classification for laryngeal carcinoma. *Cancer* 1990; 65a:1918-22.
- 6 Levi F, Pasche C, La Vecchia C, Lucchini F, Franceschi S, Monnier P. Food groups and risk of oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer* 1998; 77:705-9.
- 7 McGuirt WF, Ray M. Second laryngeal cancers in previously treated larynx. *Laryngoscope* 1999; 109: 1406-8.
- 8 Oliver AJ, Helfrick JF, Gard AD. Primary oral squamous cell carcinoma: a review of 32 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 1996;54: 949-54.

- 9 Squadrelli-Saraceno M, Sant M, Chiesa F, Spriano G, Cifola M, Marchetti C, et al. Il ritardo diagnostico nelle neoplasie del cavo orale ed orofaringe. *Acta Otorinolaryngologica Italica* 1998;3: 281-97.
- 10 Succo G, Valente G, Riva F, Gabriele P, Gervasio CF, Airoidi M, et al. Effects of continuing or stopping exposure to risk factors on natural history of laringea precancerous lesions. *Cancer J* 1994; 1:20-4.
- 11 Agudelo D, Quer M, Leon X, Diez S, Burgues J. Laryngeal carcinoma in patients without a history of tabacco and alcohol use. *Head Neck* 1997; 19:200-4.
- 12 Alvi A, Johnson JT. Development of distant metastasis after treatment of advanced-stage head and neck cancer. *Head Neck* 1997; 19:500-5.
- 13 Beatrice F, Giordano C, Vico F. Studio delle sottopopolazioni T linfocitarie e del Recettore per IL-2 (IL-2 receptor) in linfonodi laterocervicali pN0 in 20 pazienti portatori di carcinoma della testa e del collo. *L'immunoterapia dei tumori della testa e del collo*. Novara 1988.
- 14 Boffetta P, Merletti F, Faggiano F, Migliaretti G, Ferro G, Zanetti R, et al. Prognostic factors and survival of laryngeal cancer patients from Turin, Italy. A population-based study. *Am J Epidemiol* 1997; 145:1100-5.
- 15 Chen TY, Emrich LJ, Driscoll DL. The clinical significance of pathological findings in surgically resected margins of the primary tumor in head and neck carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987;13: 833-7.

- 16 Chiesa F, Squadrelli Saraceno M. Fattori prognostici in oncologia cervico-facciale. Pisa: Pacini Editore 1998.
- 17 Fattori B, Ghilardi PL, Marchetti G. Valutazione immunoistochimica dell'infiltratostromale nel carcinoma della laringe. Atti LXXVII Congresso Nazionale SIO, Stresa 1990:317-20.
- 18 Ferlito A. Cancer of the Larynx. II Vol. Raven Press 2000, pag.115.
- 19 Ferrero V. L'infiltrato peri ed intratumorale nel carcinoma laringeo: studio immunoistochimico. Atti LXXVII Congresso SIO 1990:314-7.
- 20 Peters LJ, Geopfert H, Ang KK, Byers RM, Maor MH, Guillaumondegui O, et al. Evaluation of the dose for postoperative radiation therapy of head and neck cancer: first report of prospective randomised trial. Int Rad Oncol Biol Phys 1993;26:3-11.
- 21 Califano J, Van der Riet P, Westra W, NawrozH, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. Cancer Res 1996; 56:2488-92.
- 22 Spandidos DA, Lamothe A, Field JK. Multiple transcriptional activation of cellular oncogenes in human head and neck solidi tumours. Anticancer Res 1985;5:221-4.
- 23 Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:4495-9.

- 24 Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Wiloson JK, Vogelstein B. Suppression of Human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 1990; 249:912-15.
- 25 Chen PL, Chen YM, Bookstein R, Lee WH. Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 1990; 250:1576-80.
- 26 Levine AJ. p53, the cellular gatekeep for griwth and division. *Cell* 1997; 88:323-31. Review.
- 27 Brachman DG, Graves D, Vokes E, Beckett ; Haraf D, Montag A et al. Occurrence of p53 gene deletions and human papilloma virus infection in human head and neck cancer. *Cancer Res* 1992; 52:4832-6.
- 28 Nagai MA, Miracca EC, Yamamoto L, Moura, RP, Simpson AJ, Kowalski LP, et al. Tp53 genetic alterations in head and neck carcinomas from Brasil. *Int J Cancer* 1998; 76:13-8.
- 29 Lavetru P, Adelstein DJ, Myles J, Secic M. p53 and Ki-67 as outcome predictors for advanced squamous cell cancers of head and neck treated with chemoradiotherapy. *Laryngoscope* 2001;111:1878-92.
- 30 AlsnerJ, Hoyer M, Sorensen SB, Overgaard J. Interaction between potential doubling time and Tp53 mutation: predicting radiotherapy outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int Rad Oncol Biol Phys* 2001; 49:519-25.

- 31 Bourhis J, Lubin R, Roche B, Koscielny S, Bosq J, Dubois I, et al. Analysis of p53 serum antibodies in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Nat Cancer Inst* 1996, 88:1288-33.
- 32 Bradford CR, Wolf GT, Carey TE, Zhu S, Beals TF, Truelson JM, et al. Predictive markers for response to chemotherapy organ preservation and survival in patients with advanced laryngeal carcinoma. *Otolaryngol Head Neck surg* 1999;5:534-8.
- 33 Cabelgienne A, Blons H, Waziers I, Cranot F, Houllier AM, Soussi T, et al. p53 Alterations predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective series. *J Clin Oncology* 2000;18:1465-73.
- 34 Chow V, Yuen AP, Lam KY, Ho WK, Wei WI, Prognostic significance of serum p53 protein and p53 antibody in patients with surgical treatment for head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2001: 286-91.
- 35 Gottschlich S, Maune S, Maass JD, Gorogh T, Hoffmann M, Hoffmann-Fazel A, et al. Serum p53 autoantibodies in the follow-up of the head and neck cancer patients. *Oncology* 2000; 59:31-5.
- 36 Hammel P, Boissier B, Chaumette MT, Piedbois P, Rotman N, Kouyoumdjian JC, et al. Detection and monitoring of serum of p53 antibodies on patients with colorectal cancer. *Gut* 1997; 40:356-61.
- 37 Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer therapy meets p53. *N Engl J Med* 1994;331:49-50-

- 38 Koch WM, Brennan JA, Zahurak M. p53 mutation and locoregional treatment failure in head and neck squamous cell carcinoma. *J National Cancer Inst* 1996; 88:1580-6.
- 39 Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, et al. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 1994; 266:807-10.
- 40 Narayana A, Vaughan AT, Gunaratne S, Kathuria S, Walter SA, Reddy SP. Is p53 an independence prognostic factor in patients with laryngeal carcinoma? *Cancer* 1998;82:286-91.
- 41 Osaki T, Kimura T, Tatemoto Y, Dapeng L, Yoneda K, Yamamoto T. Diffuse mode of tumor cell invasion and expression of mutant p53 protein but not of p21 protein are correlated with treatment failure in oral carcinomas and their metastatic foci. *Oncology* 2000; 59:36-43.
- 42 Overgaard J, Sorensen SB, Stausbol-gron B. Tp53 mutation is an independent prognostic marker for poor outcome of radiotherapy in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int Radiat Oncol Biol Phys* 1998, 42:43 (abstract).
- 43 Ralhan R, Nath N, Agarwal S, Mathur M, Wasylyk B, Shukla NK. Circulating p53 antibodies as early marker of oral cancer: correlation with p53 alterations. *Clin Can Res* 1998;4:2147-52.
- 44 Raybaud-Diogene H, Fortin A, Morency R, Roy J, Monteil RA, Tetu B. Markers of radioresistance in squamous cell carcinoma of the head and neck: a clinicopathological and immunohistochemical study. *J Clin Oncol* 1997;15:1030-8.

- 45 Warnakulasuriya S, Jia C, Johnson N, Houghton J. p53 and P-glycoprotein expression are significant prognostic markers in advanced head and neck cancer treated with chemo/radiotherapy. *J Pathology* 2000; 191:33-8.
- 46 Brennan JA, Sidransky D. Molecular staging of head and neck squamous carcinoma. *Cancer Metastasis Rev* 1996; 15:3-10- Review.
- 47 Califano J, Van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996;56:2488-92.
- 48 Vogelstein B, Kinzler KW. The Multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; 9:138-41.
- 49 Fattori prognostici in oncologia cervico-facciale: linee guida per l'uso nella pratica clinica.  
file:///C:/copia/aooi3131.htm (41 di 82) [14/03/2002 5.59.48].
- 50 Gion M., Mione R., Dittadi R. et al.: Marcatori tumorali circolanti: importanza di un corretto impiego nel bilancio costo/beneficio. *Argomenti di Oncologia* 1989; 10: 423-430.
- 51 Reynolds T.: Screening program raises questions on tumor marker's use regulation. *J. Nat. Cancer Inst.* 1993; 85: 424-427.
- 52 Toitou Y., Sothorn R.B., Levi F. et al.: Sources of predistable tumor marker variation within so-called normal range: circadian and circannual aspects of plasma

carcinoembryonic antigen (CEA) in health and cancer. *J. Tumor Marker Oncol.* 1988; 3: 351-356.

53 Bates S.E., Longo D.L.: Use of serum tumor markers in cancer diagnosis and management *Sem Oncol.* 1987; 14: 102-138.

54 SIPDIT Italian National Committee for Tumor Markers. *Tumor biochemical markers in clinical practice.* Wighting Editor, Milan 1990.

55 Guilloteau D., Perdrisot R., Calmettes C. et al.: Diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid (MCT) by calcitonin assay using monoclonal antibodies: criteria for the pentagastrin stimulation test in hereditary MCT. *Clin. Endocr. and Metab. J.* 1990; 71:1064-1071.

56 Akoun G.M., Scarna H.M., Milleron B.J. et al.: Serum neuron-specific enolase. A marker for disease extent and response for therapy for small cell lung cancer. *Chest.* 1985; 87: 39-46.

57 Ho S.B., Kim Y.S.: Carbohydrate antigens on cancer-associated mucinlike molecules. *Seminars in Cancer Biology* 1991; vol. 2: 389-400.

58 Bielmayer C., Szepesi T., Kopp B. et al.: CA 15.3, MCA, CAM26, CAM29 are members of a polymorphic family of mucin-like glycoprotein. *Tumor Biol.* 1991; 12: 138-148.

59 Koebel H., Scieder K., Neunteufel W., Bielmayer C.: A comparative study of mucin-like carcinoma associated antigen (MCA), CA 125, CA 19.9 and CEA in patients with ovarian cancer. *Neoplasma* 1989; 36: 473-

478.

60 Bielgmayer C., Szepesi T., Neunteufel W.: Follow up of metastatic breast cancer patients with mucinlike carcinoma associated antigen:

comparison to CA 15.3 and carcinoembryonic antigen. *Cancer Letters* 1988; 42: 199-206.

61 Lazarides E.: Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 1980; 283: 249-256.

62 Steiner P., Steven A.C., Roop D.R.: The molecular biology of intermediate filaments. *Cell* 1985; 42: 411-419.

63 Franke W.W., Schiller D.L., Moll R. et al.: Diversity of cytokeratins: differentiation specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cell and tissues. *J. Mol. Biol.* 1981; 153: 933-959.

64 Moll R., Franke W.W., Volc-Platzer B. et al.: Different keratin polypeptides in epidermis and other epithelia of human skin: a specific cytokeratin of molecular weight 46.000 in epithelia of the pilosebaceous tract and basal cell epitheliomas. *J. Cell. Biol.* 1982.

65 Plebani M.: TPA in clinical practice: state of the art and perspectives *Euro-Immunoanalyse 94 Firenze* 11-13.04.1994.

66 Carbin B.E.: Urine TPA, flow cytometry and cytology as markers for tumor invasiveness in urinary bladder carcinoma. *Urol. Res* 1989; 12: 55-61.

67 Ruiball Morell R.: Tumor markers in non neoplastic disease In: Ballesta A.M., Torre G.C., Bombardieri E. (eds) Updating on tumor markers in tissues and biological fluids. Basic aspects and clinical applications. Ed. Minerva Medica Torino 1993, 695-711.

68 Mellerik D.M., Osborn M., Weber K.: On the nature of serological tissue polypeptide antigen (TPA): monoclonal keratin 8,18 and 19 antibodies react differently with TPA prepared from human cultured carcinoma cells and TPA in human serum. *Oncogene* 1990; 5: 1007-1017.

69 Montinari F., Luporini G.: The tissue polypeptide antigen (TPA) In: Ballesta A.M., Torre G.C., Bombardieri E. (eds) Updating on tumor markers in tissues and in biological fluids. Basic aspects and clinical applications. Ed. Minerva Medica Torino 1993; 639-650.

70 Bjorklund B.: A conceptual approach to tumor antigen in the past and in the future with special reference to TPS In: Ballesta A.M., Torre G.C., Bombardieri E. (eds) Updating on tumor markers in tissues and biological fluids. Ed. Minerva Medica Torino 1993; 651-666.

71 Rylander L., Bergman T., Schoberl E. et al.: Isolation and characterization of tissue polypeptide antigen specific (TPS), a protein molecule used in follow up of malignancies (submitted for publication 1994).

72 Gion M., Mione R., Brusagnin G.: Revisione critica del concetto di soglia nell'impiego dei marcatori tumorali. *The Ligand Quarterly* 1990; 4: 512-517.

- 73 Toitou Y., Sothorn R.B., Levi F. et al.: Sources of predictable tumor marker variation within the so-called normal range: circadian and circannual aspects of plasma carcinoembryonic antigen (CEA) in health and cancer. *J. Tumor Marker Oncol.* 1988; 2: 351.
- 74 Kiang D.T., Greenberg L.J., Kennedy B.J. Tumor marker kinetics in the monitoring of breast cancer. *Cancer* 1990; 65: 193.
- 75 Cappelli G.: Mathematical model application to the kinetic study of tumor markers. *Int. J. Biol. Markers* 1994; 9: 8-14.
- 76 Marcon G., Alimena C., Siculi M. et al.: Plasma variations during childhood of an antigen tumor associated: TPS. *Beki Diagnostiss AB*, data on file, 1993.
- 77 Madersbacher S., Gregor N., Theyer G. et al.: TPS is a useful epithelial proliferation and tumor marker. *J. Urol.* 1992; 147: A911 (abs).
- 78 Björklund B.: Biochemical basis for tumor markers with special reference to TPS. IV International symposium on biology and clinical usefulness of tumor markers Barcelona 4-6.02.1993.
- 79 Rameken M., Bahlo M., Hassanein A. et al.: Secretion of CEA-CA 19-9 versus CYFRA 21.1, TPA, TPS in relation to growth kinetics, necrosis rate and proliferation studies in xenografts of human lung and pancreatic carcinomas established in nude mice. *Hamburger Symposium über Tumormarker* 5-8.12.1993

- 80 Gittermann G., Bahlo M., Klapdor R. et al.: CYFRA 21.1, TPA und TPS versus CEA/CA 19-9 r SCC und NSE beim Lungenkarzinom. Hamburger Symposium über Tumormarker 5-8.12.1993.
- 81 Comitato Nazionale per lo Studio dei Marcatori Tumoriali SIPDIT: I marcatori tumorali nella pratica clinica. Piccin Ed. Padova 1993.
- 82 Body J.J., Paesmans M., Sculier J.P. et al.: Monoclonal immunoradiometric assay and polyclonal radioimmunoassay compared for measuring neuron-specific enolase in patients with lung cancer. *Clin. Chem.* 1992; 38/5: 748-751.
- 83 Giovanella L., Ceriani L., Bandera M. et al.: Dosaggio dell'enolasi neuron-specifica (NSE) e delle citocheratine 18 (TPS) e 19 (CYFRA 21.1) nel microcitoma polmonare. (submitted for publication, 1995).
- 84 Giovanella L., Ceriani L., Bandera M. et al.: Tissue polypeptide specific antigen (TPS) and cytokeratin 19 fragment (CYFRA 21.1) immunoradiometric assay in non-small cell lung cancer evaluation. *Q. J. Nucl. Med.* 1995; 39: 285-289.
- 85 Pujol J.L., Cooper E.H., Grenier J. et al.: TPS as tumor marker in nonsmall cell lung cancer IV International Symposium on Biology and Clinical Usefulness of Tumor Markers Barcelona, February 4-6, 1993.
- 86 Pujol J.L., Grenier J., Daures J.P. et al.: Serum fragment of cytokeratin subunit 19 measured by CYFRA 21.1 immunoradiometric assay as a marker of lung cancer. *Cancer res* 1993, 53: 61-66.

- 87 Giovanella L., Ceriani L., Bandera M. et al.: Evaluation of serum markers CEA, NSE, TPS and CYFRA 21.1 in lung cancer. *Int. J. Biol. Markers* (in press, 1995).
- 88 Oesterling J.E.: Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *Urology* 1991; 145: 907-923.
- 89 Allhoff E., De Riese W., Eifinger M. et al.: Prostate specific antigen comparative clinical appreciation of a serodiagnostic measure after 8 years of experience. *World J. Urol.* 1989; 7: 12-16.
- 90 Armitage T.G., Cooper E.H., Newling D.W.W. et al.: The value of the measurement of serum prostate specific antigen in patients with benign prostatic hyperplasia and untreated prostate cancer. *J. Urol.* 1988; 62: 584-589.
- 91 Ceriani L., Cervini A., Bono A.V. et al.: Tissue polypeptide antigen in prostatic cancer. *Acta Urol. Ital.* 1994; 3: 75-78.
- 92 Vermorken JB et al, *N Engl JMed* 2008; 359:1116-27.
- 93 GLOBOCAN 2002([www.dep.iarc.fr](http://www.dep.iarc.fr)), accessed November 2008.
- 94 Lefebvre J-L *Ann Oncol* 2005;16 (Suppl 6):vi7-vii12.
- 95 Hunter KD, et al. *Nat Rev Cancer* 2005; 16 (Suppl 2):ii258-ii264.

## INDICE

Introduzione .....	2
Marcatori tumorali circolanti: definizione e criteri di utilizzo.....	17
Fattori prognostici clinici ed anatomo-patologici.....	33
Fattori molecolari coinvolti nella progressione dei carcinomi cervico-facciali.....	38
Significato clinico prognostico delle alterazioni molecolari nel carcinoma cervico-facciale .....	49
Possibile apporto dell'analisi molecolare nello staging del carcinoma cervico-facciale .....	64
Materiali e Metodi .....	68
Risultati .....	71
Conclusioni .....	74
Bibliografia .....	78
Indice .....	91