

GioFil Banca Dati Sanitaria Farmaceutica

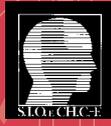
XC CONGRESSO NAZIONALE SIO
I Fattori Prognostici Clinici e Molecolari
Dei Carcinomi Cervico-Facciali
di Giorgio Cortesina



Loro Impatto Sulla Scelta delle Strategie Terapeutiche

GioFil

Tutti i Diritti Riservati



**SOCIETÀ ITALIANA
DI OTORINOLARINGOLOGIA
E CHIRURGIA CERVICO-FACCIALE**

Presidente: prof. E. de Campora

XC CONGRESSO NAZIONALE

Roma, 28-31 Maggio 2003

RELAZIONE UFFICIALE

**I FATTORI PROGNOSTICI CLINICI E
MOLECOLARI DEI CARCINOMI
CERVICO-FACCIALI: LORO IMPATTO
SULLA SCELTA DELLE STRATEGIE
TERAPEUTICHE**

di

GIORGIO CORTESINA

PACINIeditore
MEDICINA



**SOCIETÀ ITALIANA
DI OTORINOLARINGOLOGIA
E CHIRURGIA CERVICO-FACCIALE**

Presidente: prof. E. de Campora

XC CONGRESSO NAZIONALE

Roma, 28-31 Maggio 2003

RELAZIONE UFFICIALE

**I FATTORI PROGNOSTICI CLINICI E
MOLECOLARI DEI CARCINOMI
CERVICO-FACCIALI: LORO IMPATTO
SULLA SCELTA DELLE STRATEGIE
TERAPEUTICHE**

di
GIORGIO CORTESINA

PACINIeditore
MEDICINA

Relatori:

G. CORTESINA
L. PIGNATARO

Correlatori:

M. AIROLDI
R. ALBERA
F. BEATRICE
R. BOGGERO

B. CABODI
A. CAVALOT
C. GIORDANO
T. MARTONE
A. SARTORIS
G. SUCCO

Collaboratori:

E. ARISI

E. CROSETTI
B. DIGIUNI
D. PAGANI
F. PALONTA
G. PRETI
D. RONCHETTI
P. ROSSO

INDICE

<i>Introduzione</i>		
G. Cortesina.....	pag.	5
I. Storia naturale dei carcinomi del distretto cervico-facciale		
(G. Succo, E. Crosetti, B. Cabodi, M. Airoidi, A. Sartoris).....	»	9
II. Metodologie statistiche per lo studio dei fattori prognostici dei tumori della testa e del collo		
(R. Albera, T. Martone, F. Palonta, G. Cortesina)	»	43
III. I fattori prognostici clinici e anatomo-patologici		
(G. Cortesina, R. Albera, A. Cavalot, T. Martone, F. Palonta, G. Preti, P. Rosso)	»	55
IV. Fattori molecolari coinvolti nella progressione dei carcinomi cervico-facciali		
(T. Martone, L. Pignataro, F. Palonta, P. Rosso, G. Cortesina)	»	77
V. Indici biologici di aggressività		
1. <i>Fattori angiogenetici</i>		
(L. Pignataro, T. Martone, F. Beatrice, R. Albera, F. Palonta G. Cortesina)	»	99
2. <i>Molecole di adesione</i>		
(T. Martone, A. Cavalot, R. Albera, F. Palonta, P. Rosso, G. Cortesina) ..	»	105
3. <i>Progressione tumorale e metastatizzazione</i>		
(T. Martone, R. Albera, F. Beatrice, F. Palonta, G. Preti, G. Cortesina) ..	»	111
VI. Significato clinico prognostico delle alterazioni molecolari nel carcinoma cervico-facciale		
(L. Pignataro, T. Martone, E. Arisi, D. Pagani, G. Cortesina)	»	119
VII. Impatto della biologia molecolare sulla scelta delle strategie terapeutiche		
(L. Pignataro, D. Pagani, E. Arisi, T. Martone, G. Cortesina)	»	149
VIII. Studio di applicabilità e fattibilità dei fattori prognostici molecolari		
(T. Martone, L. Pignataro, R. Albera, F. Palonta, G. Cortesina)	»	169
IX. Possibile apporto dell'analisi molecolare nello staging del carcinoma cervico-facciale: proposta di un protocollo di ricerca		
(L. Pignataro, D. Ronchetti, B. Digiuni, G. Cortesina)	»	181
X. La strategia diagnostica finalizzata all'identificazione dei fattori prognostici		
(A. Cavalot, G. Preti, F. Palonta, G. Cortesina).....	»	187

XI. Correlazione tra fattori prognostici e trattamento in oncologia cervico- cefalica (R. Boggero, F. Palonta, G. Preti, P. Rosso, F. Beatrice, R. Albera, G. Cortesina, C. Giordano)	pag. 195
XII. Lo stato attuale della ricerca sulla terapia genica nei tumori del distret- to cervico-facciale (T. Martone, R. Albera, F. Palonta, G. Cortesina)	» 215
Conclusioni (G. Cortesina)	» 229
Summary	» 232

INTRODUZIONE

G. Cortesina

La ricerca degli ultimi 15 anni ha portato prepotentemente alla ribalta la biologia molecolare che, dopo essere stata all'inizio una sorta di materia per iniziati, ha incominciato ad avvicinarsi alla realtà clinica facendo intravedere a chi ha il compito di curare i malati, diagnosticandone preventivamente le malattie, un mondo tutto nuovo, talora ostico, causa una «semantica» fatta di simboli con i quali il clinico non ha consuetudine, ma anche molto affascinante perché dà subito la sensazione di essere di fronte a qualcosa di più profondo che si avvicina all'essenza dei fenomeni.

Il clinico, abituato a muoversi in un mondo di concetti che rappresentano spesso degli «epifenomeni» o punte d'iceberg di realtà sconosciute, ma che rappresentano la sua verità può all'inizio provare un senso di smarrimento, quasi un rigetto culturale, perché si rende conto che l'insieme di definizioni diagnostiche e conseguenti atti terapeutici rappresentano un mondo di conoscenze che viene messo in discussione. C'è stata, in effetti, all'inizio una specie di dicotomia tra la ricerca molecolare e la ricerca clinica (anche quella più avanzata), con incomprensioni reciproche che non hanno certo giovato al progresso della ricerca più globale, che è quella che ha lo scopo di approfondire le conoscenze dei fenomeni e di poterle utilizzare in campo pratico, con il fine ultimo di servirsene per curare i malati. La recente divulgazione, anche attraverso i media, delle scoperte molecolari che ha avuto il suo apice nel portare a conoscenza del grosso pubblico le ricerche relative al progetto Genoma, e il comparire sempre più frequente su riviste cliniche di risultati ottenuti dalla biologia molecolare, ha via via ridotto le barriere tra i due mondi culturali, facendo sempre di più intravedere la possibilità di un futuro indirizzo clinico della ricerca biologica.

Sono nati autentici dibattiti, a livello di filosofia della scienza, essendoci tutta una corrente di pensiero che rifiuta il concetto che la realtà della vita (e quindi della patologia della vita stessa), sia tutta riconducibile a piccole molecole, a segmenti di DNA, a recettori ecc.: c'è insomma chi mette in discussione che la base di tutto sia fondata su elementi «micromorfologici». S'innesci in questa diatriba anche un discorso di tipo «filosofico-religioso» che mettendo alla base della realtà biologica umana il concetto di anima, viene a ridimensionare i dati biologici ottenuti con il metodo sperimentale rendendoli meno assoluti e più relativi.

Resta il fatto che il salto in avanti che ci fanno fare nel campo della conoscenza pura (nell'accezione kantiana del termine) le nuove «evidenze» della ricerca molecolare, è cosa inequivocabile che non può essere messa in discussione.

I problemi che devono essere superati, per un vero progresso della ricerca globale che ha come fine un concreto miglioramento della cura delle malattie sono molti, ma taluni possono essere fin da ora identificati.

Il primo riguarda l'atteggiamento mentale del ricercatore di biologia molecolare che dovrebbe non entusiasarsi troppo per una scoperta settoriale (es. di una proteina o di un recettore) pensando che questa rappresenti una verità assoluta e pertanto applicabile in concreto in clinica. È necessario a nostro avviso che il confronto tra biologo e clinico, tra il risultato di una PCR e la realtà clinica della malattia, avvenga sistematicamente fin dalle fasi iniziali della ricerca, e rappresenti un vero e proprio approccio metodologico di questo tipo di ricerca: bisogna in altre parole che il clinico impari a «masticare un po' di biologia molecolare» imparandone soprattutto il modo di ragionare e il metodo, e che il biologo raggiunga una maggior confidenza con le problematiche pratiche della clinica. Si rende necessario insomma un vero e proprio salto di qualità culturale. Esiste poi un problema di metodo. Le tecniche molecolari sono sofisticate, di difficile esecuzione, costose e complesse: per questo insieme di caratteristiche esse tendono ad essere applicate su di un numero di pazienti spesso esiguo. Ma per affermare che una certa evidenza biologica ha un significato sostanziale nella nascita e nel decorso di una malattia, è necessario che la validazione di applicabilità clinica venga fatta con metodi statistici rigorosi, che richiedano quasi sempre un elevato numero di pazienti studiati. Se ad esempio si deve studiare il significato prognostico di un oncogene o di una proteina, è indispensabile che vengano bilanciati altri fattori prognostici e si deve pertanto ricorrere all'analisi statistica multivariata che richiede, oltre che ad un numero cospicuo di casi, anche mani molto esperte. In questa chiave di lettura ci accorgiamo subito che se scorriamo la letteratura, almeno la metà dei lavori non è utilizzabile a fini pratici. Esiste un problema di fondo, che forse è il più difficile da affrontare. Da qualche anno hanno incominciato ad esistere trials clinici controllati sull'uso di una certa proteina o fattore il cui effetto è ormai sicuro a scopo terapeutico, o sull'uso di molecole che bloccano quel fattore (quando questi abbia un effetto patogeno): il tutto avviene (in studi di fase III, IV) senza tralasciare la terapia tradizionale (per lo più chirurgica o radioterapica).

Si può fare l'esempio di trials clinici che hanno come background l'angiogenesi (sicuro fattore di progressione tumorale): in un braccio del trials si inseriscono i pazienti trattati con terapia tradizionale (es. chirurgia); nel secondo braccio si inseriscono pazienti trattati con chirurgia e con una sostanza che blocca l'angiogenesi tumorale (l'endostatina).

Orbene, dopo l'entusiasmo iniziale, i primi risultati dei trials clinici a terapia molecolare non sono per lo più esaltanti. Facendo un processo di autoanalisi critica, seria ed obiettiva, emerge il dubbio che un tipo di fenomeno biologico non sia governato da un solo gene, un solo recettore, una sola proteina, ma che alla base di ogni realtà biologica esista un «network» di fattori interagenti di segno talora uguale, talora contrario che rendono oltremodo difficile un'applicazione clinica «tout-court» di una sola molecola.

Pur con queste riserve, che devono essere ben presenti nella mente di ogni ricercatore la macchina della ricerca molecolare applicata procede in modo inesorabile e quindi è ipotizzabile un futuro in cui dovremo inserire nell'attuale universo conoscitivo della nostra clinica, concetti di tipo molecolare, per cui saremo costretti a procedere ad una sorta di rivoluzione culturale.

È proprio in questa ottica ed in questa previsione che riteniamo che il Clinico del 2000 si avvicini culturalmente alla biologia molecolare, e quindi riteniamo utile offrire ai clinici ORL alcune nozioni su quanto si sa oggi in materia di carcinogenesi dei carcinomi cervico-cefalici.

Con la speranza ovviamente di essere sufficientemente divulgativi (per i non addetti ai lavori) e quindi capiti.

I. STORIA NATURALE DEI CARCINOMI DEL DISTRETTO CERVICO-FACCIALE

G. Succo, E. Crosetti*, B. Cabodi, M. Airoidi**, A. Sartoris*

La storia naturale dei carcinomi del distretto cervico-cefalico 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.

La storia naturale di un carcinoma del distretto cervico-cefalico (HNC) è difficile da stimare in quanto, nell'epoca moderna, è rarissima l'assenza di qualsiasi forma di trattamento.

Studi condotti nel Regno Unito dimostrano come pazienti affetti da HNC in stadio avanzato abbiano un'aspettativa di vita, senza trattamento, di 6-12 mesi, con una mediana di 101 giorni, dipendente essenzialmente dal performance status e dalle comorbidità⁸¹.

La letteratura, come detto, è abbastanza scarsa, se si escludono le due sedi del distretto cervico-cefalico, il cavo orale e la laringe glottica, 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^{5 77 80}.

Possiamo pertanto affermare che al presente 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-cefalico.

La storia naturale è inoltre condizionata da una serie di fattori specifici, che dovrebbero essere conosciuti ed inquadrati in un contesto di concetti oncologici globali. Fra questi, le complesse interazioni tumore/ospite influenzano variabilmente il decorso clinico/biologico della malattia in ogni singolo paziente.

In questo capitolo ci occuperemo solo di alcuni fattori condizionanti la storia naturale dell'HNC e precisamente:

U.O.A. Otorinolaringoiatria, Ospedale «Martini», Torino;

* I Clinica ORL, Università di Torino;

** U.O.A. Oncologia, Ospedale «S. Giovanni» Antica Sede, Torino

- fattori anatomici;
- istotipo e grading tumorale;

lasciando ad altri capitoli la trattazione dei fattori prognostici relativi all'ospite.

Analizzeremo poi le peculiarità che caratterizzano la storia naturale e l'evoluzione dei carcinomi che si sviluppano nelle differenti sedi delle vie aero-digestive superiori.

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. L'estensione lungo le guaine perineurali o mediante emboli linfatici è in quest'ultimo caso molto meno comune.

Se il tessuto sottostante è linfatico, l'estensione avviene in modo eccentrico e molto facilmente nel contesto del tessuto linfatico stesso.

La diffusione delle cellule tumorali per via linfatica od ematica, dipende anch'essa dal tessuto sottostante la mucosa.

Interessante come Myers e Suen definiscono il problema del condizionamento della storia naturale legato al tipo di tessuto sottostante la mucosa, individuando due categorie di tumori HNC ⁵⁷.

La prima categoria è costituita da carcinomi che si sviluppano su una mucosa che ricopre tessuto linfoide. È caratterizzata da un'elevata percentuale di tumori poco differenziati od indifferenziati. Queste caratteristiche di grading influenzano non poco la storia naturale: alta percentuale di metastasi linfonodali al momento della presentazione clinica (fra il 65 ed il 80%), maggiore percentuale di metastasi a distanza evidenziabili clinicamente nel corso della storia clinica; maggiore percentuale di secondi tumori a carico delle vie aero-digestive.

I carcinomi che si sviluppano nel contesto di una mucosa che ricopra muscoli, ossa e cartilagine costituiscono la seconda categoria e sono più frequenti. Istologicamente essi sono quasi sempre tumori mediamente o ben differenziati. La loro storia naturale è caratterizzata da una percentuale di metastasi linfonodali latero-cervicali inferiore e da una minore presenza di metastasi a distanza e di secondi tumori.

I carcinomi che si sviluppano in regioni borderline assumono alternativamente le caratteristiche di entrambe le categorie.

Metastasi linfonodali

L'invasione dei linfonodi cervicali è associata a particolari modalità evolutive ed assume un particolare significato prognostico negativo nella storia naturale dell'HNC. Gli studi condotti, in particolare sugli specimen di migliaia di svuotamenti latero-cervicali, hanno consentito di individuare vari modelli di invasione dei linfonodi latero-cervicali: assenza o presenza di metastasi, rottura capsulare, emboli neoplastici nei vasi linfatici⁵². Fra questi fattori la rottura capsulare (55%) e gli emboli neoplastici determinano un notevole aggravamento di prognosi. Sembra essere il primitivo arresto di emboli tumorali nella capsula linfonodale o a livello iuxtacapsulare a determinare un'estensione extracapsulare più precoce nel corso della storia naturale della malattia⁷⁶.

Due sono i parametri clinici che maggiormente si correlano al grado di invasione delle linfoghiandole cervicali: la dimensione ed il grado di fissità agli elementi anatomici cervicali.

L'incidenza di metastasi linfonodali dipende essenzialmente dalla sede, dalla dimensione e dal grading del tumore primitivo.

La distribuzione delle metastasi linfatiche è in gran parte spiegabile in termini meccanici ed anatomici. Le funzioni di filtro e di barriera dei linfonodi appaiono solitamente efficaci nello stadio iniziale della malattia dal momento che la metastatizzazione linfatica è generalmente limitata alla prima stazione linfonodale. Su questo rationale si fondano le moderne strategie di staging incentrate sulla teoria del linfonodo sentinella⁶⁹. Dal momento che la struttura linfonodale è progressivamente rimpiazzata dal tumore metastatico, il flusso linfatico locale può essere distorto, riflesso e persino invertito, direzionando cellule tumorali nate nel linfonodo metastatico, verso linfonodi liberi da malattia.

Il linfonodo metastatico diventa in questo modo il focus di una diffusione terziaria. Ciò può avvenire per via linfatica ed ematica a causa non solo delle ampie interfacce linfatico/ematiche presenti alla base del collo, ma pure attraverso piccoli shunt linfatico/venosi o attraverso invasioni a tutto spessore e penetrazioni all'interno della vena giugulare interna, partendo dai linfonodi adiacenti alla stessa⁵⁷.

Metastasi a distanza - secondi tumori

Il corso del carcinoma delle vie aero-digestive superiori è frequentemente solo locale o loco/regionale. Ciò significa che, nella maggioranza dei casi, il corso apparente di questo cancro (sino alla morte) è confinato al tratto aero-digestivo superiore ed ai linfonodi cervicali.

Più della metà dei pazienti affetti da HNC decede per l'estensione locale e loco/regionale della malattia. Questo dato non si allinea con quanto avviene per i carcinomi delle altre parti del corpo.

Metastasi a distanza, che occorrono con relativa bassa frequenza, sono clinicamente evidenti solo nel 10-15% dei casi. Tuttavia, ciò può solo risultare un'impressione clinica. Al presente, infatti, gli esami che servono per la diagnosi di metastasi a distanza vengono raramente effettuati nei pazienti terminali, portando ad un rischio di netta sottostima dell'evento. Infatti gli studi autoptici su pazienti deceduti per HNC, dimostrano che vi è un'alta percentuale di metastasi clinicamente silenti, nell'ordine del 35-50% dei casi⁷⁴.

I carcinomi multipli del tratto aero-digestivo sono comuni, nell'ordine del 7-9% dei casi. Questo dato è analogo solo al carcinoma della cute e del tratto digestivo.

La frequenza di secondi tumori varia in accordo alla sede del tumore primitivo. Questa elevata frequenza sembra essere specialmente correlata all'azione degli stessi fattori irritanti locali sulle stesse mucose di questa regione, ad eccezione delle fosse nasali e del rinofaringe ⁷³.

ISTOTIPO TUMORALE

La multiformità dei tessuti presenti nel distretto cervico-cefalico determina la differente frequenza dei vari istotipi tumorali, caratterizzati a loro volta da comportamenti biologici e modalità evolutive peculiari ¹⁵.

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 metastatizzazione 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 metastatizzazione linfonodale loco-regionale (80%) e da una maggiore percentuale di metastasi per via ematica (28%).

Il carcinoma muco-epidermoide si localizza prevalentemente nel contesto delle ghiandole salivari e nel distretto naso-sinusale. L'evoluzione e la variabilità loco-regionale rendono ragione della suddivisione di tale istotipo in alto e basso grado di malignità ²².

Sempre nel contesto del complesso salivare e del distretto naso-sinusale, si sviluppa il carcinoma adenoido-cistico, un istotipo tumorale particolare per quanto riguarda le modalità di estensione e la storia naturale. La particolarità di questo tumore è la forte tendenza a diffondersi lungo le guaine perineurali, anche a notevole distanza dal tumore primitivo. L'evoluzione linfatica è meno frequente, mentre più frequentemente si rileva l'incidenza di metastasi per via generale, anche a notevole distanza di tempo dalla diagnosi e dal trattamento primitivo. La storia naturale di questo tumore è caratterizzata da un'evoluzione lenta e poco aggressiva ²².

L'adenocarcinoma, che risulta l'istotipo più frequente nel distretto naso-sinusale, è un tumore caratterizzato da un'elevata malignità locale, con tendenza alla recidiva locale, ma da una scarsa tendenza alla diffusione per via linfatica od ematica. Ciò rende ragione del rationale di trattamento, rappresentato da approcci chirurgici più aggressivi, condotti per via transfacciale e transcranica, al fine di raggiungere a tutti i costi la completa radicalità locale.

Clinica

La somma della fase pre-clinica e della fase clinica dell'HNC consentono di suddividere schematicamente la storia naturale di questi tumori, come appare dagli schemi di Morrison ⁵⁴ (Fig. 1) e di Cortesina ¹⁵ (Fig. 2).

Esaminando le varie tappe, si possono individuare due periodi che possono condizionare in modo decisivo la successiva storia naturale del tumore in questione.

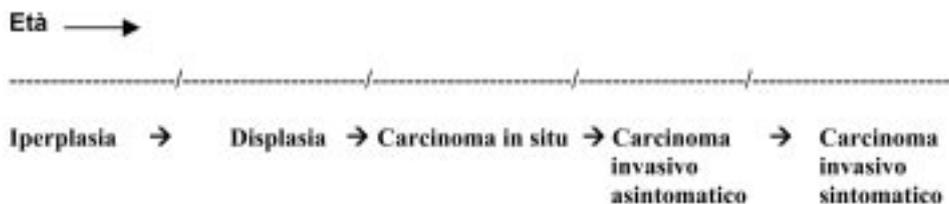


Fig. 1.

Schema dello sviluppo progressivo del cancro laringeo dall'iperplasia al carcinoma invasivo sintomatico.

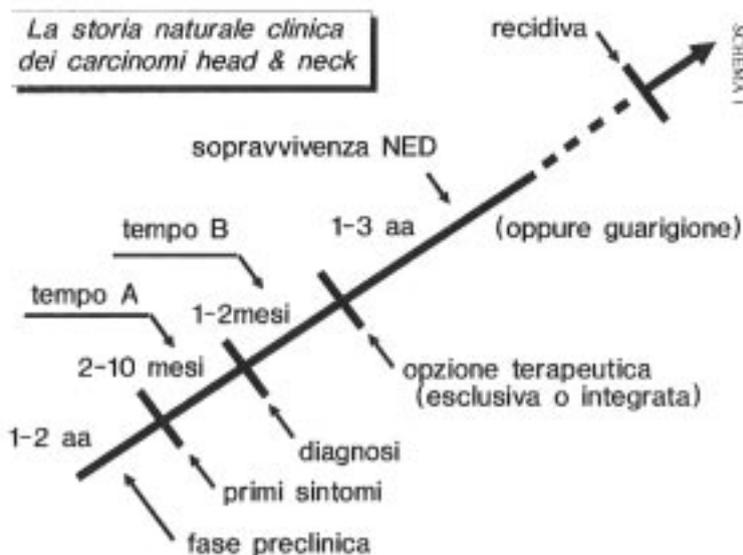


Fig. 2.

Storia naturale clinica dei carcinomi *head and neck*.

Si tratta della cosiddetta «detectable pre-clinical phase» (DPCP), in cui una precancerosi od un early cancer può già essere diagnosticato istologicamente pur non avendo ancora dato sintomi o segni di sé ed il periodo primi sintomi/diagnosi, che rappresenta il momento in cui la gravità dei sintomi, i comportamenti soggettivi, la sensibilità del test diagnostico e la sua facile o difficile applicabilità influenzano maggiormente la tempestività o al contrario il ritardo diagnostico.

Al presente, richiamandosi anche alle peculiarità istologiche dei tessuti rappresentati nel distretto cervico-cefalico, esistono in pratica solo due sedi, il cavo orale e la laringe glottica, in cui la DPCP è in pratica diagnosticabile.

Ciò è certamente spiegabile con la sensibilità e la facile applicabilità dei test diagnostici, ma anche con il fatto che la storia naturale, in queste sedi, presenta caratteristiche di carcinogenesi più tipiche, con le varie tappe cronologicamente ed istologicamente meglio rappresentate.

Infatti nel vario panorama dell'oncologia cervico-cefalica solo su queste due sedi sono reperibili con costanza e buona frequenza lavori sulle precancerosi e sui tentativi di screening, che si pongono come obiettivo la modificazione della storia naturale della malattia.

Relativamente al periodo primi sintomi/diagnosi Cortesina et al. riportano che sulla base della durata del suddetto periodo è possibile distinguere due categorie di HNC:

1) tumori con tempo compreso fra 2-8 mesi: laringe glottico-sottoglottica, cavo orale anteriore, orofaringe (talora), ghiandole salivari, infrastruttura;

2) tumori con tempo > 8 mesi: laringe sottoglottica, ipofaringe, rinofaringe, massiccio facciale (meso-sovrastuttura), orofaringe, laringe sovraglottica.

Per finire gli epidemiologi puntano con forza il dito sul problema della potenziale stazionarietà o reversibilità dei carcinomi iniziali, specie nello stadio di carcinoma in situ, il che potrebbe rappresentare un serio ostacolo etico alla proposta di trattamenti che determinino un outcome negativo sulla qualità di vita ⁵⁸.

Relativamente al primo aspetto sussistono evidenze circa alcune sedi in cui l'evoluzione avviene per lungo tempo a livello superficiale, interessando un'area sempre maggiore di mucosa senza che ciò esiti in un'evoluzione in carcinoma invasivo; ciò spesso si associa a vaste aree di degenerazione multifocale della mucosa ed è alla base delle teorie della field cancerisation e dell'alta frequenza di secondi tumori rilevata, specie per alcune sedi ¹⁶.

Per l'analisi del secondo problema ci si deve appoggiare agli studi autoptici, anche se un po' datati, che dimostrano, specie per la laringe, un'elevata percentuale di focolai di carcinoma in situ assolutamente non evoluti verso forme invasive e non responsabili del decesso del soggetto ³.

STORIA NATURALE DEI CARCINOMI DELLE CAVITÀ NASALI E DEI 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.

Seno mascellare

I tumori maligni del seno mascellare possono essere considerati primitivi solo nel 40% dei casi; nel 30% originano a livello della mucosa etmoidale, mentre meno frequentemente costituiscono un'evoluzione da parte di neoplasie insorte a livello

delle mucosa alveolare o del palato. In genere i tumori maligni originatisi all'interno di un seno mascellare non manifestano la tendenza ad interessare l'etmoide o la porzione superiore della fossa nasale corrispondente, ma tendono ad estendersi in basso, in alto e posteriormente, raggiungendo rispettivamente il palato, l'orbita, i tessuti molli cutanei e le fosse pterigomascellare (FPM) ed infratemporale (FIT).

Per comprendere la tendenza evolutiva dei tumori maligni del seno mascellare occorre ricordare che l'antro di Higmore presenta 4 peduncoli: osseo, malare, palatino (solidi) ed etmoido-nasale (fragile). Pertanto le vie di diffusione più frequenti sono:

- via palato-alveolare: i tumori a partenza dal pavimento del seno mascellare hanno una particolare tendenza ad invadere il processo alveolare del mascellare superiore, causando la progressiva caduta dei denti premolari e molari superiori. L'esteriorizzazione, oltre che attraverso gli alveoli dentari, può avvenire anche attraverso il palato duro ed il fornice gengivale, che appare inizialmente occupato da una massa sottomucosa, che, in un secondo tempo, si ulcera;

- via superiore, verso l'orbita ed il suo contenuto, protetti dal periostio, ma raggiungibili attraverso le vie lacrimali ed il canale infraorbitario, spesso deiscende. L'invasione orbitaria può anche avvenire posteriormente nel contesto di un interessamento della base cranica. Superata la parete orbitaria, la neoplasia incontra una tenace resistenza da parte della periorbita, che viene per lungo tempo dislocata, senza essere infiltrata;

- via anteriore: i rilievi superiore ed inferiore fanno parte delle strutture resistenti della faccia, ma sono separati da aree di relativa debolezza, ad esempio a livello della fossa canina, che viene invasa precocemente nelle forme più aggressive e dà accesso alle parti molli del viso;

- via posteriore: il processo neoplastico può giungere ad interessare la pterigoide, la fossa pterigopalatina (FPP) e la loggia dei muscoli pterigoidei, da qui, attraverso il forame rotondo ed il tronco del nervo infraorbitario può penetrare in fossa cranica media;

- via zigomatica, qualora sia presente l'incostante prolungamento malare, a sua volta punto di partenza per l'estensione verso la FIT e la fessura sfenomascellare. L'invasione della FIT è relativamente frequente e rappresenta un elemento prognostico negativo delle neoplasie del seno mascellare. La tuberosità del mascellare, infatti, è in rapporto con la FPP solo nella sua porzione superiore; il seno mascellare, invece, è in rapporto con la FIT con la sua faccia posteriore (a livello della fossa pterigoidea) e con quella laterale (a livello della regione retromaxillo-zigomatico). La struttura ossea della tuberosità del mascellare, sostanzialmente fragile, viene precocemente invasa e superata dalle neoplasie interessanti la porzione posteriore del seno mascellare. Schwaab⁷² ha riscontrato che l'invasione della FIT è isolata solo nel 57% dei casi; spesso è associata a coinvolgimento dell'orbita (40%) e della base cranica (3%). Secondo Kondo et al.⁴² frequente è anche l'interessamento anteriore, ed addirittura secondo Bouaziz et al.⁹ il coinvolgimento della FIT è sempre associato ad altre aree di invasione, al di fuori del seno. Raggiunta la FIT, la neoplasia può erodere il basicranio o penetrare attraverso i forami della base (ovale, rotondo, spinoso) o le strutture che li attraversano (2° e 3° branca del trigemino), invadendo la fossa cranica media.

Etmoide

La situazione anatomico-topografica dell'etmoide condiziona le modalità di propagazione delle neoplasie primitive di questa regione. I tumori maligni originatisi nell'etmoide possono estendersi:

- verso la fossa nasale, occupandola ed infiltrandone le pareti (turbinato inferiore, setto);
- all'orbita, quasi sempre attraverso l'erosione della lamina papiracea, ma teoricamente anche tramite i fori etmoidali anteriore e posteriore, in cui decorrono le arterie omonime;
- al sacco e al dotto nasolacrimale;
- al seno mascellare ed al seno frontale: la diffusione avviene lungo i sepimenti ossei ed il complesso ostiometale;
- al seno sfenoidale, per estensione diretta dall'etmoide posteriore;
- all'apice orbitario, per erosione della sottile e talora deiscete lamina ossea, che separa le cellule etmoidali posteriori dal cono orbitario posteriore e dal nervo ottico;
- al tavolato osseo frontale, alle ossa nasali ed ai tegumenti naso-frontali;
- alla fossa cranica anteriore (FCA). Solitamente la progressione neoplastica avviene attraverso la lamina cribrosa, nella quale la presenza dei fori e la struttura dei filuzzi del nervo olfattivo, che in essi decorrono, favoriscono la progressione neoplastica per continuità o per colonizzazione dei linfatici delle guaine perineurali (Ca squamosi, Ca adenoidocistici, adenocarcinomi). Esistono poi neoplasie, come gli estesi neuroblastomi, che originano a livello della fessura olfattiva, «a cavallo» della lamina cribrosa e che tendono a dare un precoce interessamento microscopico della dura del basicranio anteriore. Una seconda via di penetrazione alla FCA è rappresentata dal seno frontale, nel caso in cui la sua parete posteriore sia invasa ed erosa.

L'infiltrazione delle pareti rinofaringee e del seno sfenoidale, per quanto teoricamente possibile, è evenienza molto rara, così come l'interessamento della FPM e della FIT. Queste due ultime direttrici sono proprie dei tumori maligni del seno mascellare. Esistono comunque neoplasie etmoideo-mascellari molto estese, che si espandono secondo direttrici proprie di ciascuna delle due sedi: si tratta di casi nei quali è difficile stabilire con esattezza la sede di partenza del tumore^{11 75}.

Seno frontale

I tumori maligni del seno frontale sono rari. Possono esteriorizzarsi attraverso la parete anteriore del seno stesso oppure possono penetrare nell'orbita, attraverso la sua parete superiore. La parete posteriore del seno offre una certa resistenza alla progressione neoplastica; pertanto l'invasione endocranica da parte di questi tumori è un evento piuttosto tardivo. In alcuni casi si può verificare l'invasione del seno controlaterale. Inoltre si può avere l'interessamento dell'etmoide e da qui l'estensione in varie direzioni.

Seno sfenoidale

Raramente il seno sfenoidale è la sede di origine di una neoplasia maligna: in letteratura si annoverano solo alcuni casi. Questi tumori hanno tendenza ad esten-

dersi verso l'endocranio per usura del pavimento sellare e del clivus superiore e medio. Talora si può osservare un interessamento diretto del nervo ottico e, attraverso quest'ultimo, invasione dell'apice orbitario.

I tumori maligni naso-sinusalmente raramente metastatizzano a distanza in fase iniziale (osso, polmone, fegato, pachimeningite neoplastica). Appena più frequente risulta essere la possibilità di metastasi linfonodali loco-regionali, allorché la neoplasia abbia superato lo stadio iniziale²². L'incidenza delle metastasi linfonodali al momento della diagnosi varia dal 3% al 16% (mediana del 10%); con il progredire della malattia questa percentuale raggiunge il valore del 44%. Metastasi linfonodali «tardive» possono comparire nei 4 anni successivi al primo trattamento, soprattutto in concomitanza di una recidiva loco-regionale. Differente è la situazione di una neoplasia naso-sinusale che si sia estesa verso il basso alla cavità orale. Il rischio di metastasi, in questo caso, è analogo a quello di una neoplasia primitiva del cavo orale. Come riassunto dalla Tabella I metastasi linfonodali si riscontrano più frequentemente nei carcinomi naso-sinusalmente di tipo indifferenziato ed in quelli mucoepidermoide²². La sede delle metastasi linfonodali è in rapporto con la sede di insorgenza e con le modalità di sviluppo del tumore.

Tab. I.

Incidenza di metastasi linfonodali e metastasi a distanza.

	Metastasi linfonodali (%)	Metastasi a distanza (%)
Carcinoma naso-sinusale	5,4-21	1,2-11,1
– Tipo squamocellulare		
• fosse nasali	6,6-10,7	
• seno mascellare	3,9-21,4	2,6-13,8
– Tipo indifferenziato	15,2-19,4	
– Tipo a cellule cilindriche	1,6-8,3	
– Tipo verrucoso		
Adenocarcinoma	2,6-22,2	Eccezionali (secondarie a metastasi linfonodali)
Carcinoma adenoido-cistico	9-16	18-58
Carcinoma mucoepidermoide	20-30	10

È giusto ricordare che i collettori linfatici dei seni paranasali, unendosi ai collettori delle cavità nasali, formano un sistema di vasi linfatici a direzione antero-posteriore, suddivisibile in 3 gruppi. Il gruppo superiore si porta verso il rinofaringe e, dopo aver perforato il muscolo costrittore superiore, termina nei linfonodi retrofaringei, i cui vasi efferenti sono tributari del gruppo superiore delle linfoghiandole

cervicali profonde. Il gruppo medio segue, con decorso parallelo, il gruppo superiore, terminando anch'esso nei linfonodi retrofaringei. Il gruppo inferiore, decorrendo lungo la parete posteriore del palato molle, si unisce ai vasi linfatici efferenti tonsillari e termina nel gruppo medio dei linfonodi cervicali profondi. Da questi dati si può dedurre che in tutte le neoplasie maligne della sovrastruttura e nella maggior parte di quelle della mesostruttura, il gruppo superiore dei linfonodi cervicali profondi è la seconda stazione linfonodale invasa dalla neoplasia; viceversa nei tumori maligni dell'infrastruttura la prima stazione linfonodale sede di metastasi è costituita dal gruppo medio delle linfoghiandole cervicali profonde.

STORIA NATURALE DEI CARCINOMI DEL 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. Dai dati in Letteratura ^{4 8 13 19 21 44 71} si rileva che la parete laterale è in genere quella di più frequente localizzazione. Il versante nasofaringeo del palato molle è di rado sede d'insorgenza di una neoplasia maligna. Inoltre molti carcinomi nasofaringei, in particolar modo i tipi 2 e 3 secondo la classificazione WHO, insorgono a livello della fossetta di Rosenmüller.

Le neoplasie maligne rinofaringee tendono ad invadere le formazioni anatomiche contigue, diffondendosi:

- anteriormente;
- lateralmente;
- posteriormente;
- inferiormente;
- superiormente.

Estensione anteriore

L'invasione nasale è tipica delle neoplasie insorte sulla volta del rinofaringe. Questi tumori possono interessare anche i seni paranasali e l'orbita. L'invasione di quest'ultima può avvenire attraverso:

- la lamina papiracea dell'etmoide;
- la parte superiore del seno mascellare;
- la fessura orbitaria inferiore.

Estensione laterale

L'estensione laterale avviene attraverso la porzione cartilaginea della tuba uditiva ed il muscolo elevatore del velo palatino, sino a raggiungere la loggia retrostiloidea e di qui importanti strutture vascolo-nervose: a. carotide interna, v. giugulare interna, IX, X, XI, XII paio di nervi cranici, simpatico cervicale. Il danno alle strutture nervose è dovuto più frequentemente a fenomeni compressivi esercitati dai linfonodi retro e parafaringei piuttosto che ad infiltrazione diretta da parte della neoplasia.

Propagandosi lungo la tuba, il processo neoplastico può raggiungere la cassa del timpano e la mastoide.

Estensione posteriore

I tumori maligni rinofaringei, in particolar modo quelli insorti sulla parete posteriore, possono superare tale parete ed interessare i muscoli prevertebrali, raggiungendo la fossa cranica posteriore attraverso il foro occipitale.

Estensione inferiore

L'estensione inferiore decorre lungo le pareti laterali rinofaringee ed i pilastri tonsillari. Tal estensione si riscontra in circa 1/3 dei pazienti con tali tumori.

Estensione superiore

L'invasione endocranica si verifica generalmente nei tumori insorti a livello della regione tubarica. Diversi Autori hanno riscontrato che l'interessamento endocranico è radiograficamente evidenziabile nel 25% dei pazienti al momento della diagnosi ⁷¹.

L'invasione endocranica può avvenire attraverso:

- seno sfenoidale, che può essere interessato attraverso il suo ostio naturale o per usura del basisfenoide;
- la tuba uditiva, per usura delle sue pareti, giungendo a contatto della base cranica;
- grande ala dello sfenoide, di solito usurata da tumori insorti a livello della fossa del Rosenmüller;
- foglietto posteriore dell'aponevrosi salpingo-faringea (che si sdoppia per raccogliere la tuba) fino a livello dell'apice della rocca petrosa;
- i fori della base cranica. Attraverso essi, le neoplasie possono giungere a livello della fossa cranica media, in una zona denominata crocevia o angolo petrosfenoidale, situata in vicinanza dell'apice della rocca petrosa, in cui sono siti il ganglio di Gasser e le branche del trigemino, il seno cavernoso, i nervi oculomotore, trocleare, abducente ed ottico. Da questa regione, progredendo a colata di lava, lungo la dura madre, che è generalmente infiltrata, il tumore può estendersi posteriormente, determinando le classiche sindromi paralitiche associate posteriori.

Per comprendere la diffusione metastatica linfonodale dei carcinomi nasofaringei è necessario ricordare l'anatomia della rete linfatica rinofaringea e delle stazioni linfoghiandolari, cui essa fa capo. La rete linfatica mucosa si estende lungo tutta la superficie del rinofaringe ed è particolarmente ricca in prossimità degli accumuli linfatici (tonsilla faringea), ponendosi in relazione con le reti linfatiche della tuba uditiva, delle fosse nasali e dell'orofaringe. Dalla rete mucosa si dipartono piccoli tronchi linfatici posteriori e laterali; i primi giungono ai linfonodi retrofaringei, di cui il più craniale è noto come linfonodo di Rouvière, situati nello spazio retrofaringeo; i secondi afferiscono ai linfonodi giugulari sottodigastrici. Da qui l'eventuale metastatizzazione può raggiungere i linfonodi giugulari medi ed inferiori, quelli sopraclavicolari e quelli della catena dello spinale. L'interessamento del linfonodo di Rouvière può, inoltre, facilitare la diffusione del processo neoplastico al processo trasverso dell'atlante ed al foro giugulare, determinando un'alterazione

strutturale di queste formazioni. Per quanto riguarda la diffusione metastatica linfonodale, di particolare interesse sono:

- la bilateralità, presente in almeno il 50% dei casi, anche in tumori primitivi strettamente monolaterali ⁵³;

- la fissità, osservabile anch'essa in oltre il 50% dei casi;

- il livello di interessamento: sono purtroppo abbastanza frequenti i casi con localizzazione al IV e V livello linfonodale (10-36%), talora anche indipendentemente dall'eventuale interessamento dei livelli superiori ⁵³;

- non correlazione tra incidenza di metastasi linfonodali e stadio T: dati recenti hanno evidenziato che lesioni T4 presentano una percentuale di interessamento linfoghiandolare più bassa rispetto a tumori T1-T3;

- correlazione fra grading ed interessamento metastatico linfonodale: i carcinomi squamosi a basso grado di malignità determinano metastasi linfonodali in misura inferiore (73%) rispetto a quelli ad alto grado di malignità.

Nella Figura 3 riportiamo i dati di incidenza di adenopatie latero-cervicali palpabili al momento della diagnosi di carcinoma rinofaringeo ²³.

L'incidenza delle metastasi a distanza al momento della diagnosi iniziale è abbastanza rara. Bohorquez ha osservato il 3% in 152 casi ⁸, Brugère et al. il 7% in 296 casi ¹⁰, Petrovich et al. il 9% in 256 casi ⁶⁴, Hsu e Tu il 7% in 995 casi ³⁶ ed infine Ellouz et al. il 6% in 939 casi ²¹. Le sedi più frequentemente interessate sono i polmoni, lo scheletro, il fegato, l'encefalo. Occorre rilevare come esista una correlazione diretta fra presenza e stadio di N e presenza di metastasi a distanza. Petrovich et al. hanno rilevato 3 M1 in 63 casi N0 (4,8%), contro 19 M1 in 193 casi N1-

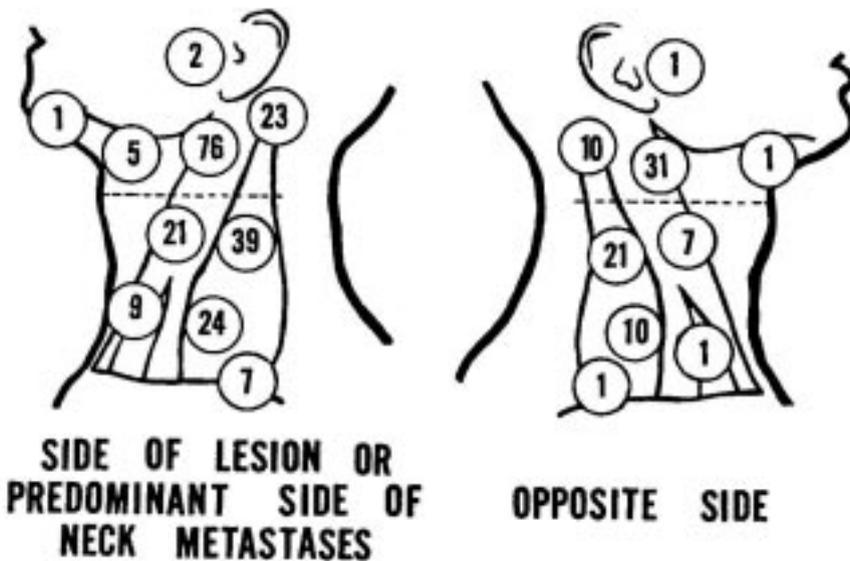


Fig. 3.

Distribuzione delle metastasi linfonodali laterocervicali nei carcinomi rinofaringei.

2-3 (9,8%)⁶⁴; analogamente Hsu e Tu hanno verificato 6 M1 in 246 N0 (2,4%) e 19 M1 in 543 N1-2 (3,5%), contro 41 M1 in 177 N3 (23,2%) ed hanno notato che la correlazione fra estensione del T e presenza di M1 era vicina a valori di significatività statistica³⁶. Le metastasi a distanza appaiono spesso nell'ulteriore decorso, anche dopo successo della terapia su T e su N. Khor et al. hanno osservato la comparsa di metastasi in 99 su 352 casi esaminati (28,1%), con una sopravvivenza media di 4 mesi e con decesso nel 91% entro un anno dal loro apparire³⁹.

STORIA NATURALE DEI CARCINOMI DEL 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 invasivi¹⁵.

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, nella stretta analogia di fattori di rischio, nell'identica prevalenza nella popolazione, nel riscontro di vaste aree di precancerosi «satelliti» 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-cefalico 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.

Per poter descrivere la storia naturale dei tumori maligni del cavo orale, è utile analizzarla separatamente per ogni singola sottosede.

Palato duro

Il palato duro, insieme al processo alveolare superiore, costituisce il «tetto» della cavità orale ed il «pavimento» del seno mascellare e delle fosse nasali. Il palato duro è rivestito da fibromucosa, strettamente adesa al periostio del mascellare, nel cui contesto sono indovate, tra tralci di connettivo fibroso denso della sottomucosa, numerosissime ghiandole salivari minori.

Le neoplasie maligne del palato duro possono estendersi:

- verso l'alto, con invasione dei seni paranasali;
- postero-lateralmente, con infiltrazione della tuberosità mascellare con una possibile estensione allo spazio pterigo-mascellare posteriormente e/o alla mucosa geniena lateralmente.

Il drenaggio linfatico è in piccola parte diretto verso le stazioni linfonodali del muscolo buccinatore e/o di quelle periparotidiche ed in gran parte alle stazioni sottomandibolari e jugo-digastrica (livelli I e II).

Tuttavia, mentre la rete vascolare arteriosa e venosa è ben rappresentata nello strato mucoso, sottomucoso e periosteo, la rete dei vasi linfatici è presente solo nello strato mucoso e sottomucoso. Inoltre le afferenze linfatiche mucose e sottomucose attraverso i muscoli faringopalatino e glosso palatino, si connettono con la rete linfatica tributaria della faringe e della lingua.

Da questi dati si evince come il drenaggio linfatico del palato duro sia relativamente poco sviluppato rispetto alle altre sedi del cavo orale, giustificando così la tardiva e poco frequente diffusione per via linfatica dei tumori maligni di questa sede ⁴⁹.

Lingua

La lingua mobile rappresenta una delle sedi più frequentemente interessate dai tumori del cavo orale (dal 17,5% al 36% dei casi) ⁶⁰.

Le lesioni iniziali sono localizzate principalmente nei 2/3 posteriori della superficie ventrale e marginale della lingua; rari sono i carcinomi del dorso linguale (5,9% su 1066 casi consecutivamente osservati da Frazell). 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 ⁴⁵.

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 obiettivamente 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/leucoplasica.

La confluenza di lesioni inizialmente distinte, naturalmente, incrementa l'estensione superficiale del tumore. Questo fenomeno, indicato con il termine di «field cancerisation», è favorito da numerosi fattori. Innanzitutto l'epitelio ai confini della lesione, seppur senza caratteristiche neoplastiche, presenta generalmente alterazioni, tra le quali la più comune è l'atrofia. In secondo luogo, la muscolatura linguale esercita un effetto di «squeezing» (spremitura) sul tumore, favorendo la progressione laterale del medesimo ⁴⁶. Li et al. hanno dimostrato una velocità di progressione linfatica superiore nel caso di tumori insorti in aree più riccamente vascolarizzate ⁴⁶. Inoltre un ruolo molto importante in questo fenomeno è svolto dalla rete linfatica superficiale mucosa e sottomucosa, costituita da collettori, con decorso tortuoso, disposti parallelamente alla superficie linguale, in cui la corrente linfatica presenta una bassa velocità di flusso ed un orientamento non unidirezionale. Pertanto le cellule neoplastiche «in transito» vi si possono arrestare, senza raggiungere i collettori perpendicolari tributari delle stazioni linfonodali, costituendo delle vere e proprie colonie metastatiche superficiali, contigue al tumore primitivo.

Infine vi è da considerare che un fattore cancerogeno può determinare nei distretti mucosali vicini, focolai di iniziazione e promozione, da cui può derivare la formazione di tumori multipli.

Per quanto riguarda l'infiltrazione profonda, la sottomucosa, il tessuto adiposo ed il connettivo lasso offrono una semplice resistenza passiva alla crescita tumora-

le. Diversamente, il connettivo denso delle membrane, fasce e legamenti è in grado di resistere all'infiltrazione diretta e può, in qualche modo, deviare od indirizzare la progressione tumorale parallelamente ad esso.

Il tessuto muscolare, viceversa, viene invaso precocemente, dati i suoi rapporti con la sottomucosa o, direttamente, con la mucosa, nelle sedi in cui la sottomucosa è assente (dorso linguale). Avvenuta l'infiltrazione del muscolo, la progressione è favorita dalle contrazioni muscolari ed avviene tra fibra e fibra, in corrispondenza del perimio, che rappresenta la via di minore resistenza.

A seconda della sede della neoplasia, e quindi del muscolo linguale sottostante infiltrato, il processo neoplastico può estendersi in direzione anteriore oppure posteriore, verso la base della lingua, i pilastri palatoglossi ed il velo del palato.

Inoltre, il tumore, raggiunto il tronco di un nervo intralinguale, diramazioni del nervo linguale o del nervo ipoglosso, può diffondere facilmente lungo gli spazi peri-neurali.

Watson JC et al. hanno osservato che nel 39% dei tumori del corpo linguale è presente infiltrazione e progressione peri-neurale⁸⁶.

Questo tipo di infiltrazione è tipico dei carcinomi adenoidocistici, ma si osserva anche per gli istotipi squamocellulari; inoltre sembra essere più frequente nel caso di neoplasie voluminose (diametro > 2,5 cm), mentre non sembra in relazione con il grading.

Accrescendosi progressivamente, la lesione tumorale presenta un'evoluzione extra-distrettuale, con interessamento del pavimento orale laterale o anteriore e della base della lingua. Anteriormente e ventralmente, il dotto di Wharton può rappresentare un'ulteriore via di fuga neoplastica, costituendo un locus di «*minoris resistentiae*», con estensione verso il pavimento pelvi-buccale e la loggia sottomascellare.

L'incidenza delle adenopatie metastatiche loco-regionali da carcinomi della lingua varia, in Letteratura, dal 35% al 62,5%^{24 30}. In tal ambito va anche considerata l'incidenza delle metastasi «occulte» (valutabile nel caso delle lesioni trattate chirurgicamente con svuotamenti del collo), che varia dal 14,5% nel caso di tumori T1 al 30,6% nei T2.

In un lavoro di Van den Brekel et al.⁸⁴, l'incidenza delle adenopatie cervicali, nei carcinomi della lingua mobile, è dell'ordine del 20% per i T1, 50% per i T2-T3 e del 75% per i T4. I motivi anatomico-fisiologici di questa elevata incidenza di metastasi linfonodali sono probabilmente da ascrivere da un lato all'azione di spematura esercitata sulla massa tumorale dalla muscolatura linguale e, dall'altro, alla ricchezza dei vasi linfatici di questi distretti.

Nei carcinomi della lingua mobile, i linfonodi jugo-digastrici sono quelli più comunemente interessati (84,7%)²⁴. I linfonodi sottomandibolari sono prevalentemente coinvolti nei tumori della punta linguale; i linfonodi giugulo-carotidei al II e III livello, nei tumori del terzo medio e posteriore della lingua.

La profondità di infiltrazione è probabilmente il fattore predittivo più importante per la presenza di metastasi linfatiche regionali.

L'incidenza di metastasi bilaterali o controlaterali è nel complesso elevata essendo tra il 6,6% ed il 16,6% ed è ovviamente più elevata nel caso di lesioni mediane²⁴.

Inoltre è interessante notare come il 47% dei carcinomi linguali con metastasi ipsilaterali trattate tende a sviluppare metastasi metacrone controlaterali.

Le cellule metastatiche possono colonizzare il linfonodo e, successivamente, infiltrare i tessuti contigui per rottura della capsula linfonodale. La probabilità di rottura capsulare è in rapporto alle dimensioni del linfonodo interessato: è stato riscontrata rottura capsulare nel 75% dei linfonodi metastatici con dimensioni superiori ai 3 cm.

Pavimento orale

I tumori del pavimento orale costituiscono circa il 28% di tutte le neoplasie della bocca, con una ripartizione pavimento orale anteriore/pavimento orale laterale del 10% versus 18%. Raramente, tuttavia, queste neoplasie costituiscono un'entità anatomo-oncologica isolata, più frequentemente si osserva l'infiltrazione di strutture limitrofe, come la lingua (70% dei casi), la mucosa gengivale (52%), il trigono retromolare (25%), l'orofaringe (20%), l'osso mandibolare (15%) e la cute (5%). D'altra parte, anche altri tumori, in particolare quelli linguai, spesso giungono ad interessare il pavimento orale laterale (75% dei casi). Da ciò emerge chiaramente il ruolo di «crocevia oncologico» di questa sede, soprattutto nel momento in cui si debba procedere ad una programmazione chirurgica.

I tumori maligni del pavimento orale possono rimanere, anche a lungo, piccoli e superficiali; tuttavia spesso manifestano una chiara e precoce tendenza infiltrativa profonda. Non è infrequente il riscontro di neoplasie apparentemente in stadio iniziale, che presentano, invece, uno sviluppo profondo «ad iceberg», con ampia colonizzazione del pavimento orale muscolare e della loggia sottomascellare.

Questi tumori possono estendersi in direzione:

- antero-laterale, a «lambire» il versante mediale dell'orletto gengivale. Attraverso tale via costante è la colonizzazione dei piani sottomucosi e del piano muscolare milo-joideo, e in seconda istanza della loggia sottomascellare e del suo contenuto. Un'altra modalità di infiltrazione della ghiandola, tutt'altro che infrequente, è quella retrograda per via periduttale;

- mediale-profonda, con invasione della muscolatura estrinseca della lingua. Attraverso l'infiltrazione diretta del muscolo jo-glosso, le cellule neoplastiche possono trovare una facile via di diffusione antero-posteriore, dato il percorso particolare di tale muscolo. Ancor più medialmente e profondamente, il processo neoplastico può giungere a coinvolgere i muscoli longitudinale inferiore e genio-glosso, seguendo le cui fibre il tumore può diffondere in direzione anteriore e profonda, dato il continuo «massaggio» muscolare;

- postero-laterale, con interessamento dell'orletto gengivale posteriore e del trigono retromolare. Da qui il tumore tende a «scivolare» anteriormente, circondando il colletto degli ultimi elementi dentari e, successivamente, il versante vestibolare gengivale. Nel caso di pregresse avulsioni dentarie, l'assenza del periostio espone l'alveolo alla rapida colonizzazione tumorale, con apertura di una via preferenziale all'infiltrazione ossea profonda. Inoltre la neoplasia, accrescendosi, tende ad invadere il solco amigdaloglosso e da qui a procedere seguendo la superficie mediale della mandibola. A tale livello sarà agevole l'infiltrazione della porzione ventrale posteriore dei muscoli jo-glosso, longitudinale inferiore della lingua, stilo-glosso e palato-glosso. In particolare, l'interessamento di queste due ultime strutture muscolari espone al rischio di estensione craniale, per via retrograda, della neoplasia, fino

a raggiungimento del piano muscolare laterale orofaringeo, della loggia parafaringea e dei muscoli pterigoidei. Dal solco amigdaloglosso, il tumore può giungere ad infiltrare la plica faringo-epiglottica e l'aditus del seno piriforme dal suo versante profondo. Inoltre, lateralmente, l'invasione del planum osseo della superficie mediale della mandibola, determina rapida colonizzazione del canale mandibolare, attraverso l'orifizio di Spix, esponendo al pericolo di una diffusione perineurale retrograda del tumore, verso la fossa pterigoidea e la base cranica;

– postero-mediale, con invasione della base della lingua, attraverso il solco amigdaloglosso o, per via profonda, dalla porzione mobile o dalla muscolatura estrinseca della lingua.

Nel caso di lesioni neoplastiche localizzate in corrispondenza del pavimento orale è interessante ricordare la particolare conformazione morfologica dei collettori linfatici di primo ordine, tributari del corpo linguale e della sede pelvi-buccale.

In tale distretto, infatti, le vie linfatiche sono beanti, di grosso calibro e con andamento grossolanamente rettilineo, prive di strutture valvolari. Ciò, unito all'azione di «massaggio» esercitata dalla massa neoplastica sulle fibre muscolari, giustifica l'estrema facilità di «caduta» metastatica verso le prime stazioni linfonodali, sottomentoniere, sottomandibolari e jugo-digastriche.

Per quanto riguarda l'incidenza di adenopatie nel caso di carcinomi del pavimento orale, vengono riportate percentuali del 40% di N+. In una revisione clinico-statistica del 1992, relativa a 89 casi di carcinomi del pavimento orale laterale, De Campora e Colleghi hanno notato un'incidenza di 21 casi N0, 6 casi N1, 1 N2a, 3 N2b e 5 N3¹⁸.

Mucosa geniena

I tumori maligni raramente interessano la superficie mucosa geniena. Generalmente sono neoplasie epiteliali; nel 5% dei casi originano dalla ghiandole salivari accessorie.

Le neoplasie della guancia sono caratterizzate da un elevato potenziale metastatico per via linfatica e dalla tendenza ad invadere le strutture profonde⁶⁰. L'unica barriera anatomica alla diffusione tumorale è quella costituita dal complesso muscolo-aponevrotico buccinatore, situato subito al di sotto della superficie mucosa della guancia, teso tra la commissura labiale in avanti ed il legamento pterigo-mascellare indietro. Il superamento di tale limite e l'invasione della cute costituiscono uno dei più importanti fattori prognostici negativi.

I tumori maligni sviluppati sull'epitelio di superficie della mucosa della guancia si possono estendere superficialmente in tutte le direzioni ed in profondità, con interessamento del tessuto connettivo, delle strutture nervose (rami del V e VII paio di n.c.) e dei vasi venosi e linfatici. L'invasione ossea, frequente negli stadi avanzati, può avvenire per erosione/infiltrazione a partire dal periostio, oppure per estensione nel midollo osseo o ancora, specie nei soggetti edentuli, a partire dal bordo alveolare.

L'incidenza delle metastasi linfonodali varia a seconda delle casistiche dal 10% al 50%¹⁸; le stazioni linfatiche più frequentemente interessate sono quelle sottomascellari e sottodigastriche.

È stata, inoltre, dimostrata una correlazione tra presenza di metastasi occulte e profondità di invasione tumorale: il rischio di metastasi occulte è superiore al 25%

nei tumori di spessore variabile da 2 a 8 mm, mentre sale oltre il 40% per le neoplasie con grado di invasione profonda superiore a 8 mm.

Trigono retromolare e istmo delle fauci

Queste due sedi sono rilevanti in patologia neoplastica in quanto frequentemente interessate secondariamente da tumori delle strutture adiacenti: pilastro glosso-palatino, velo palatino, fornice gengivo-genieno inferiore o superiore, zona di transizione fra parte mobile e base della lingua. Per questo motivo appare conveniente parlare di regione genio-palato-glossa, unità di strutture con comunanza di indicazioni terapeutiche.

Dal punto di vista teorico, è opportuno distinguere due sedi principali: il trigono retromolare vero e proprio e la regione delle fauci.

Trigono retromolare: questa regione è sede pressoché esclusiva di carcinomi squamosi. Generalmente si estendono in superficie, in direzione mediale, con coinvolgimento del pilastro anteriore e del velo, e verso il basso, con interessamento della gengiva inferiore, della mucosa della faccia interna della mandibola e del pavimento orale posteriore. La progressione verso l'alto e verso la guancia è meno frequente.

L'infiltrazione in profondità comporta una precoce invasione del periostio e dell'osso, soprattutto a livello del bordo alveolare inferiore, ove la corticale è sottile e perforata e la componente midollare è regolarmente presente. Attraverso la midollare la neoplasia può raggiungere il canale mandibolare ed il nervo alveolare inferiore, con possibile diffusione perineurale.

A livello del rafe pterigomandibolare, l'infiltrazione avviene spesso in senso mediale, sottominando il pilastro palatino e dirigendosi verso il muscolo pterigoideo interno. In questa progressione il nervo linguale e quello alveolare inferiore possono rimanere coinvolti. Lateralmente, la neoplasia può giungere ad interessare il muscolo buccinatore e, tardivamente, il massetere. Benché rara, questa via di progressione è più grave, in quanto il processo espansivo può portarsi al di sotto dell'arcata zigomatica verso la fossa infratemporale.

La metastatizzazione per via linfatica regionale interessa in primo luogo i linfonodi giugulo-carotidei superiori e medi (II e III livello); non raro il coinvolgimento iniziale di quelli sottomandibolari posteriori.

Regione delle fauci: questa regione comprende tutto ciò che sta al davanti della tonsilla, e cioè il pilastro palatino anteriore, la faccia anteriore del velo palatino, il solco glosso-tonsillare e la porzione adiacente del margine linguale, corrispondente alla zona di transizione tra parte mobile, orale, della lingua ed il contorno della base. Pertanto, questa regione si configura come una zona in cui una neoplasia, anche limitata in estensione, può interessare contemporaneamente due o tre formazioni a cavallo fra cavo orale ed orofaringe.

I tumori maligni di questa sede possono diffondersi:

- in superficie, verso il velo palatino superiormente, il pavimento orale posteriore anteriormente, il trigono retromolare antero-lateralmente, la zona di transizione linguale medialmente, la parete faringea postero-lateralmente;
- in profondità, interessando il muscolo palato-glossa, e più tardivamente i muscoli costrittore della faringe e pterigoideo interno, superati i quali, si ha invasione ossea, neurale (nervi linguale ed alveolare inferiore).

La diffusione linfatica avviene verso i linfonodi jugo-digastrici (II livello) come prima stazione; talora possono essere raggiunti i linfonodi spinali medi (V livello).

L'incidenza di metastatizzazione linfatica varia dal 28% al 34% al momento della diagnosi.

Gengiva

Nell'ambito dei tumori maligni epiteliali maligni del cavo orale, il carcinoma della gengiva e del bordo alveolare costituisce un'entità nosologica di non facile inquadramento sia dal punto di vista topografico che classificativo.

Infatti la limitata estensione anatomica di questa sede ed il coinvolgimento precoce dei tessuti adiacenti, anche in stadi non molto avanzati, rendono spesso difficile individuare il sito di insorgenza della neoplasia.

Inizialmente il tumore tende a rimanere superficiale; l'estensione al bordo alveolare è frequente nelle forme anteriori ad esordio primitivo sulla gengiva.

La penetrazione del tumore nell'osso mandibolare è facilitata dalla presenza degli alveoli dentari, che oppongono una scarsa resistenza all'invasione neoplastica.

Peculiare caratteristica di questi tumori rispetto alle altre sedi del cavo orale è la diffusione metastatica, che si manifesta con incidenza minore e assai più tardivamente in confronto alle altre sedi (labbro, lingua, pavimento orale, trigono) e comunque in un periodo compreso tra 6 e 10 mesi dall'insorgenza della neoplasia.

Per quanto concerne il drenaggio linfatico dei tumori della gengiva, esso è in parte comune con quello del pavimento orale, della ghiandola sottolinguale e della porzione mobile della lingua. Comprende diversi collettori, che drenano ai linfonodi sottomentonieri e sottomandibolari se la localizzazione del tumore è anteriore, ai gangli sottodigastrici e sopraomoioidei se laterale.

Il drenaggio mucoso superficiale si estende ad entrambe la parti della linea mediana e favorisce un'ampia comunicazione linfatica tra i due lati.

L'incidenza di adenopatie metastatiche è pari complessivamente al 30% e si ritiene sia in relazione alle dimensioni della neoplasia, al grading istopatologico ed all'infiltrazione del periostio. È stato, infatti, osservato che le lesioni ulcero-infiltrative, le forme indifferenziate e le localizzazioni posteriori manifestano una linfofilia nettamente più spiccata.

STORIA NATURALE DEI CARCINOMI DELL'OROFARINGE

I tumori maligni dell'orofaringe rappresentano circa il 3% di tutti i tumori solidi.

La sede orofaringea assume caratteristiche di entrambe le categorie descritte da Myers, essendo comunque una sede ove è presente abbondante tessuto linfoide.

Analizzeremo separatamente la storia naturale di ogni singola sottosede.

Loggia tonsillare

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.

Il processo neoplastico può estendersi:

- anteriormente, lungo le fibre del muscolo palato-glosso, fino a raggiungere la muscolatura propria della lingua ed il trigono retromolare. Gli zaffi neoplastici possono arrivare a circondare il colletto dell'ultimo molare inferiore ed in caso di pregressa avulsione dell'ottavo, l'assenza del periostio mandibolare espone l'alveolo dentario alla rapida colonizzazione tumorale, con conseguente possibilità di invasione del canale mandibolare;

- in alto, con invasione del palato molle. Questa è una delle condizioni di più frequente riscontro in quanto i movimenti muscolari dei pilastri palatini, durante la deglutizione e la fonazione, operano una «spremitura» del tumore, con precoce diffusione degli zaffi neoplastici lungo i fasci muscolari. La colonizzazione in profondità del velo del palato generalmente è una condizione più tardiva, data la resistenza offerta dall'aponeurosi palatina alla progressione neoplastica. Prevale piuttosto la diffusione superficiale, con superamento della linea mediana ed interessamento dei muscoli tensore ed elevatore del palato, lungo le cui fibre il tumore può giungere ad infiltrare la fossa infratemporale, la tuba di Eustachio e da qui persino le cavità petrose. Nei casi più avanzati, nella sua progressione verso l'alto, la neoplasia può arrivare ad interessare la tuberosità del mascellare superiore, con usura ossea e possibile apertura di fistole oro-antrali, ma anche correre lungo la salienza ossea tuberosa ed infiltrare la fossa pterigo-palatina;

- posteriormente: dopo aver superato l'istmo delle fauci, il tumore può raggiungere il cavo rinofaringeo;

- infero-medialmente, con coinvolgimento del solco amigdaloglosso, del pavimento orale posteriore e della regione glosso-epiglottica. A livello vallecolare la lesione neoplastica tende a colmare il nidus vallecularae, giungendo poi ad invadere l'epiglottide e la base della lingua nella metà corrispondente;

- postero-lateralmente: il tumore può oltrepassare i limiti della loggia tonsillare, invadendo gli spazi parafaringei (pre- e retrostiloideo), la fossa infratemporale e quella pterigo-palatina. La diffusione della malattia alla loggia pre-stiloidea comporta l'interessamento pressoché costante della muscolatura pterigoidea. Da qui la neoplasia può «scavalcare» il bordo posteriore della mandibola, insinuarsi al di sotto della capsula parotidea e raggiungere il muscolo massetere e i tessuti molli della guancia. L'ulteriore progressione tumorale agli spazi parafaringei può condurre all'infiltrazione della catena del simpatico cervicale. Inoltre, nella sua progressione in direzione laterale, la neoplasia può giungere ad erodere il planum osseo della superficie mediale della branca montante della mandibola, con invasione del forame mandibolare, in cui decorrono il nervo alveolare inferiore ed i vasi mandibolari.

Palato molle

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. Questo pattern di crescita può comportare un precoce interessamento del muscolo peristafilino esterno (tensore del pa-

lato molle), con invasione della fossa infratemporale e del muscolo peristafilino interno (elevatore del palato molle) e coinvolgimento della tuba. Da questi sedi la neoplasia puoi, poi, sconfinare verso la base cranica (specie verso la rocca petrosa).

I tumori maligni del palato molle possono anche estendersi:

- posteriormente, con progressiva invasione del rinofaringe;
- in alto ed in avanti, con possibile coinvolgimento del forame palatino, attraverso il quale il tumore può raggiungere, dopo aver infiltrato il nervo omonimo, la fossa pterigomascellare;
- superiormente, con usura della tuberosità del mascellare superiore ed interessamento delle cavità sinusali;
- inferiormente: propagandosi lungo le fibre del muscolo glosso-palatino, la neoplasia può giungere ad interessare la muscolatura intrinseca della lingua. Seguendo invece le fibre del muscolo faringo-palatino, la diffusione avviene verso la parte laterale faringea.

Parete posteriore dell'orofaringe

I rari tumori maligni che insorgono a livello della parete posteriore orofaringea presentano tre caratteristiche peculiarità:

- si accrescono generalmente in superficie, con interessamento circonferenziale delle pareti, in modo analogo alle neoplasie laringee sovraglottiche;
- oltrepassano facilmente la linea mediana, per cui coinvolgono le stazioni linfonodali laterocervicali bilateralmente;
- è frequente, data l'esiguità dello spazio fra parete mucosa e muscolatura, il coinvolgimento diretto dei muscoli costrittori faringei con conseguente «discesa» del tumore per via retrofaringea-fasciale.

Base lingua

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 e dei tessuti molli dell'amaca pelvi-buccale e glosso-epiglottica, nonché della regione tiro-jo-epiglottica. 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.

Questi tumori possono estendersi lateralmente, con interessamento del solco amigdale-glosso e delle pliche faringo-epiglottiche, faringo-palatine e glosso-epiglottiche (radice dei pilastri palatini), con conseguente massiccia infiltrazione del pavimento orale postero-laterale.

Lo scivolamento postero-laterale della neoplasia, con il superamento della plica faringo-epiglottica, espone alla massiva invasione del seno piriforme, che si realizza prevalentemente «a colata».

Spesso un tumore della base lingua con evoluzione posteriore, dopo aver colmato il «nidus» vallecolare, tende a circondare l'epiglottide a ferro di cavallo ed a scivolare lungo gli apici dei seni piriformi e, più medialmente, lungo le pliche ariepiglottiche. Inoltre si può verificare l'erosione della barriera glosso-epiglottica, con estensione diretta del tumore nella loggia infratemporale.

L'epiglottide può essere scavalcata, con successivo interessamento della laringe, oppure infiltrata a tutto spessore.

L'orofaringe presenta una ricca rete linfatica, che può essere distinta in tre componenti: rete mucosa, sottomucosa e muscolare. I tre contingenti presentano ampie connessioni tra di loro e con la rete linfatica delle regioni limitrofe.

Le stazioni linfatiche tributarie del circolo interstiziale orofaringeo sono rappresentate dalle linfoghiandole latero-cervicali del II e III livello. Stazioni linfatiche di secondo ordine sono invece rappresentate dai linfonodi del IV e V livello secondo Robbins; le stazioni linfatiche sottomandibolari e sottomentoniere costituiscono sede di metastatizzazione tardiva da parte dei carcinomi orofaringei e come tale ad indice prognostico sfavorevole.

La parete posteriore dell'orofaringe ha un drenaggio linfatico di tipo segmentario con dipendenza, parte dai linfonodi retrofaringei, parte dai giugulo-carotidei e iugo-digastrici.

Nelle lesioni più alte della parete posteriore e postero-laterale (giunzione epimeso-faringea), le prime adenopatie possono essere retro-viscerali (pre-vertebrali). La presenza di una adenopatia latero-cervicale può rappresentare già una metastatizzazione di secondo ordine.

Particolare distribuzione presentano i linfatici in corrispondenza della regione glosso-epiglottica. Esistono infatti così ampie connessioni fra i linfatici delle vallecule, dell'epiglottide e della base della lingua al punto che la regione può essere considerata unitaria sotto il profilo linfatico.

Le anastomosi esistenti tra contingente mucoso, sottomucoso e muscolare della rete linfatica portano alla confluenza di un numero limitato ed incostante⁷⁹ di collettori. Questi, in parte laterali ed in parte mediani, si dirigono posteriormente, piegando quindi bruscamente ad angolo retto verso il basso e raggiungendo i linfonodi latero-cervicali profondi, attraverso la parete faringea. Essi appaiono di calibro notevole, beanti e privi di strutture valvolari. Ciò facilita la progressione degli emboli neoplastici, quasi per «caduta» fino alle stazioni linfatiche più prossimali (iugo-digastrica, giugulo-carotide alta). La diffusione è favorita dalla continua spremitura (squeezing secondo gli autori anglosassoni) che sul T opera la muscolatura dinamica della lingua, del pavimento pelvi-buccale, dell'apparato muscolare di sospensione dei visceri del collo, negli atti della fonazione, deglutizione, masticazione, etc.

La stazione linfatica iugo-digastrica costituisce, comunque, il fulcro della metastatizzazione cervicale da carcinoma orofaringeo. Nel caso di carcinoma tonsillare le metastasi sono spesso bilaterali e la stazione iugo-digastrica costituisce la sede elettiva. I carcinomi che esordiscono, invece, a livello glosso-epiglottico metastatizzano spesso bilateralmente, data la disposizione anatomica mediana della sede.

Può invece sorprendere l'evidenza di una mancanza di simmetria tra i livelli di metastatizzazione dei due lati; spesso si assiste infatti, nei casi N2c, a metastatizzazione iugo-digastrica di un lato e medio-giugulare o spinale nel lato opposto. Il «salto» della stazione iugo-digastrica con comparsa di ripetizioni giugulari medio-basse o al triangolo posteriore del collo può infatti sottendere una diffusione profonda del T in quelle logge del pavimento orale o del distretto cervicale tributarie di «livelli» linfatici più bassi.

Inoltre, i dati relativi al rapporto fra incidenza di N ed istotipo, dimostrano come la presenza di metastasi loco-regionali sia percentualmente più elevata nei casi

ad istologia anaplastica e, fra i casi metastatici, come l'incidenza di un più severo grado di N, coincide con il carcinoma indifferenziato e con il carcinoma scarsamente differenziato. Garrett riporta un'incidenza di N+, in rapporto al carcinoma indifferenziato superiore del 30% rispetto a quella presentata dal carcinoma epidermoidale²⁷. Analoghe osservazioni sono rilevabili in altre serie cliniche^{28 29 63 83}

Nell'ambito del carcinoma epidermoidale stesso vengono inoltre definite delle gradualità di «rischio» loco-regionale rapportate al gradiente di differenziazione cellulare.

Le metastasi sistemiche si presentano in percentuale bassa al momento della diagnosi, nei pazienti affetti da carcinoma dell'orofaringe. I dati reperibili in Letteratura riportano percentuali dell'8-17% sulla totalità delle osservazioni^{48 61 62 78 85}.

STORIA NATURALE DEI CARCINOMI DELL'IPOFARINGE E DELL'ESOFAGO CERVICALE

I tumori maligni dell'ipofaringe e dell'esofago cervicale rappresentano il 5-10% delle neoplasie che possono insorgere a livello delle VADS. A fronte di una sintomatologia d'esordio piuttosto scarsa, questi tumori si caratterizzano per un comportamento biologico aggressivo locale, con precoce metastatizzazione 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.

Ipofaringe

Nel 70% dei casi i tumori maligni ipofaringei insorgono a livello di un seno piriforme; nel rimanente 20-30% dei casi si sviluppano sulla parete faringea posteriore o laterale nell'area retrocricoaidea.

Seni piriformi: i tumori maligni di questa sede sono generalmente voluminosi quando pervengono alla diagnosi; pertanto è spesso difficile identificare il loro esatto sito di origine all'interno del seno.

Questi tumori possono estendersi:

– medialmente, con invasione della parete laterale della laringe sopraglottica. In tal caso Kirchner⁴¹ ritiene che tali tumori abbiano spesso un comportamento simile a un carcinoma transglottico, crescendo nello spazio paraglottico ed estrinsecandosi a livello del ventricolo;

– lateralmente, con erosione della cartilagine tiroidea ed invasione diretta della tiroide. In alcuni casi la ghiandola può risultare libera da infiltrazione per contiguità, ma serbatoio di emboli tumorali linfatici od ematici. È stato osservato che quando la parte laterale del seno è clinicamente coinvolta, la cartilagine tiroidea risulta infiltrata in oltre la metà dei casi (55%), mentre quando il tumore si estende all'apice del seno, la cartilagine è quasi sempre invariabilmente infiltrata³⁷;

- superiormente, con infiltrazione del base lingua od estensione attraverso l'area retrocricoaidea ed interessamento del seno opposto;
- inferiormente, con coinvolgimento dell'esofago cervicale, circostanza peraltro, meno frequente.

Parete faringea: Cunningham et al.¹⁷ hanno osservato che, su 164 casi di carcinoma della parete faringea, il 55% originava dalla parete posteriore ed il 45% dalla parete latero-posteriore.

Le lesioni insorte in questa sede sono più frequentemente infiltranti ed ulcerate che esofitiche. Si caratterizzano per un pattern di crescita insidioso, con fronte di infiltrazione periferico difficilmente individuabile a livello macroscopico e talora sub-microscopico. Infatti la neoplasia dal piano sottomucoso può riemergere in superficie, anche a notevole distanza dal focolaio principale. Questi tumori tendono ad infiltrare in profondità i muscoli prevertebrali e a diffondersi in superficie in forma circonferenziale, coinvolgendo la laringe ed, in fase avanzata, i pilastri tonsillari, il palato molle, il nasofaringe, i seni piriformi o l'esofago.

È stato riscontrato che i carcinomi della parete laterale, in circa il 50% dei casi, invadono la cartilagine tiroidea, che a questo livello è molto spesso ossificata e quindi più vulnerabile, aprendo la via alla diffusione metastatica verso la tiroide e le parti molli cervicali⁴⁰.

Regione retrocricoaidea: i carcinomi retrocricoi dei comunemente invadono la cartilagine cricoide e i muscoli crico-aritenoidei. Spesso presentano un pattern di crescita circonferenziale, estendendosi, attraverso le pareti muscolari laterali, direttamente alla tiroide.

Non rara è la presenza di focolai di metastatizzazione sottomucosa a livello dell'esofago cervicale; come pure l'invasione massiva dell'esofago per estensione diretta alla bocca di Killian.

L'ipofaringe è un distretto dotato di un ricco sistema di drenaggio linfatico, costituito da vie dirette e crociate tributarie dei linfatici profondi del collo.

I collettori linfatici dell'ipofaringe superiore accompagnano l'arteria laringea superiore attraverso la membrana tiro-ioidea e drenano nei linfonodi jugo-digastrici e giugulari medi. Il drenaggio linfatico dell'ipofaringe inferiore avviene, invece, attraverso il plesso tiroideo verso i linfonodi ricorrenziali. Entrambi i sistemi superano ampiamente la linea mediana, aprendo la via alla metastatizzazione linfatica bilaterale.

La distribuzione delle metastasi linfonodali predilige il livello II (jugo-digastrici), seguito in ordine di frequenza dal livello III, I, IV, V e VI¹¹ (Fig. 4).

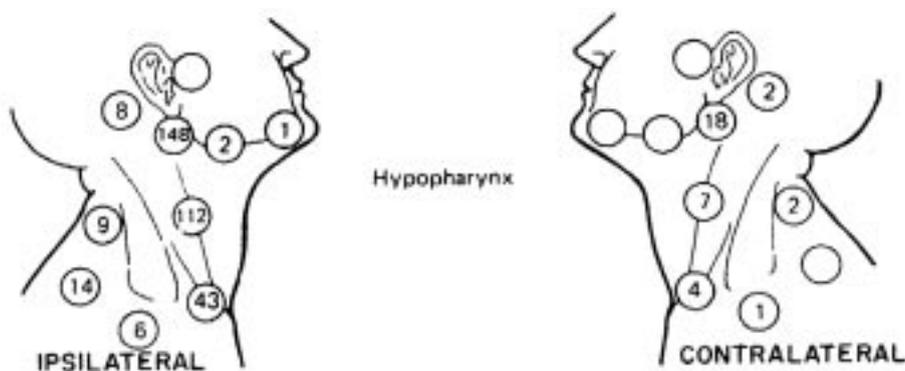
Il rischio di metastasi linfonodali è di circa il 75% per il seno piriforme, 60% per la parete faringea posteriore, 40% per l'area retrocricoaidea.

Solo il 10% dei tumori del seno piriforme presenta metastasi linfonodali bilaterali, mentre tale reperto è più comune nei carcinomi retrocricoi dei ed è molto frequente (60%) in quelli della parete faringea posteriore³¹.

Le metastasi linfonodali si presentano precocemente nella storia naturale della malattia. È stato riscontrato che il 60% dei tumori del seno piriforme presenta linfonodi positivi al momento della diagnosi e che molti carcinomi dell'area retrocricoaidea e dell'apice del seno piriforme con linfonodi clinicamente negativi hanno in realtà metastasi occulte nella tiroide e nei linfonodi ricorrenziali^{6 12 32 35 47}.

Fig. 4.

Distribuzione delle metastasi linfonodali latero-cervicali nei carcinomi dell'ipofaringe.



N_0	N_1	N_{2A}	N_{2B}	N_{3A}	N_{3B}	$N_1, N_3 / \text{Total}$
65	51	27	45	51	28	$202/267 = 75\%$

I linfonodi retrofaringei, situati in alto nel piano prevertebrale e non compresi nell'intervento di svuotamento linfonodale del collo, sono interessati in oltre il 40% dei tumori della parete faringea posteriore e del seno piriforme.

L'incidenza globale di metastasi a distanza, calcolata sulla media di tutte le sottosezioni e di tutti gli stadi, è pari a circa il 24%, con progressivo incremento fra i casi in remissione clinica loco-regionale e in quelli vivi con persistenza o recidiva di malattia.

Esofago cervicale

Circa il 20% di tutti i carcinomi esofagei insorgono nell'esofago cervicale.

Il cancro esofageo è caratterizzato dalla peculiare capacità di estensione a distanza dall'epicentro tumorale, sia per continuità con il fronte tumorale primitivo, sia per colonizzazione linfatica. Tali colonie a distanza possono non essere evidenziate macroscopicamente; talora, tuttavia, possono comparire a tale distanza dal focus primitivo da essere definite skip metastasis.

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 vene⁶⁸.

L'incidenza di metastasi loco-regionali, al momento della diagnosi, è pari al 50-80% dei casi⁵⁹. I linfonodi laterocervicali più frequentemente interessati sono quelli paratracheali e paraesofagei (84%); seguono i linfonodi mediastinici (28%), sopra e infraclavicolari (7%)⁵⁵.

Esistono in Letteratura osservazioni, almeno per il segmento toracico, circa una correlazione esistente fra lunghezza del tumore e probabilità di metastasi linfonodali.

dali: tumori della lunghezza < 5 cm sono associati a metastasi nel 45% dei casi; al contrario quelli di lunghezza maggiore presentano metastasi nel 95% dei casi ^{25 26}. Non si ha conferma di medesime osservazioni per il distretto cervicale, probabilmente per la difficoltà di selezionare un numero sufficiente di tumori che interessino selettivamente il solo segmento cervicale dell'esofago.

Metastasi a distanza sono di frequente osservazione, soprattutto a livello epatico e polmonare (16% fegato, 31% polmoni/pleura, 9% osso, 4% reni, 2% surreni) ^{25 26}.

STORIA NATURALE DELLE PRECANCEROSI E DEI CARCINOMI DELLA LARINGE

Risulta molto difficile correlare l'obiettività clinica delle diverse precancerosi laringee con criteri di possibilità evolutiva in senso neoplastico.

Ad un unico aspetto macroscopico spesso corrispondono molteplici quadri microscopici, caratterizzati da potenzialità degenerativa maligna assai diversa, anche coesistenti nell'ambito della stessa lesione, in modo tale da rendere indispensabile, al fine di giungere ad una diagnosi di certezza, un riscontro di tipo anatomico-patologico.

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 ³³.

Dal suo studio derivano informazioni su quali e quante lesioni possano, sul piano clinico-statistico, recidivare o progredire verso forme invasive ³⁴; il tempo medio di recidiva e/o progressione; la percentuale di regressione delle precancerosi con o senza terapia causale, medica e/o chirurgica; in quale misura la prevenzione primaria (allontanamento dei fattori di rischio) e secondaria (controlli endoscopici periodici, chemioprevenzione) eserciterebbero un'influenza positiva ⁵¹.

In tale contesto, il capitolo della storia naturale delle precancerosi laringee non è ancora sufficientemente sviluppato per una serie di motivazioni riassunte nei seguenti punti:

- disomogeneità delle classificazioni utilizzate da vari autori nel presentare le personali osservazioni;
- disomogeneità nell'approccio diagnostico-terapeutico;
- l'approccio diagnostico alle precancerosi laringee è spesso un atto terapeutico conclusivo, sufficiente a modificarne la storia naturale.

Un aiuto estremamente valido ci deriva dal raffronto della loro prevalenza in popolazioni di fumatori (ottenuta sia mediante studi autoptici che mediante studi clinici), con la prevalenza del carcinoma invasivo in popolazioni con analoghe caratteristiche di esposizione al fumo di tabacco.

In uno studio autoptico su 971 uomini morti per cause diverse dal carcinoma laringeo, serie considerabile rappresentativa di tutti i gruppi di età, Auerbach ³ trovò nei 653 soggetti fumatori una prevalenza di carcinoma in situ della corda vocale pari al 15,7% ed una prevalenza di carcinoma invasivo del 0,7%.

Tale dato, seppur su un numero di osservazioni molto inferiore, era già stato descritto nel 1958 da Michailow.

Sartoris ⁷⁰, nel corso di uno studio endoscopico su soggetti forti fumatori ed asintomatici, descrive una prevalenza di lesioni precancerose (clinicamente evidenti) del 7,8% e nessun caso di carcinoma invasivo (Tab. II).

Tab. II.

Prevalenza di lesioni precancerose della laringe.

Autore	Descrizione Studio	N.	% Displasie e/o Ca in situ	% Ca invasivo
Auerbach et al.	Autoptico	653	15,7 Ca in situ	0,7
Sartoris et al.	Endoscopia + istologia	102	7,8 Displasia + Ca in situ	0

Il confronto fra i dati di Auerbach, di Sartoris e quelli di altri autori (Steiner nel 1985 riporta una prevalenza di lesioni displasiche delle VADS pari al 0,8% su un campione di 3.712 fumatori) ⁷⁹ seppur risultando difficile a causa della disparità di analisi istologica dell'organo laringeo, dimostrano come la prevalenza delle lesioni precancerose istologicamente obiettivabili sia notevolmente più alta rispetto alla prevalenza delle lesioni precancerose riscontrabili endoscopicamente e dello stesso carcinoma.

Infatti noi sappiamo che nei fumatori il rischio di sviluppare un carcinoma invasivo laringeo è circa il 4%; questo, raffrontato ai dati di Auerbach ³ significherebbe 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.

In ogni caso è molto difficile stabilire la velocità in cui avvengono tali trasformazioni dal momento che l'età media di insorgenza delle lesioni precancerose clinicamente evidenti e con bassi gradi di displasia di regola precede di circa 10 anni l'età media di insorgenza del carcinoma invasivo, mentre l'età di insorgenza di lesioni caratterizzate da gradi di displasia moderata-grave è praticamente sovrapponibile a quest'ultima ⁷⁰.

I fattori di rischio aumenterebbero la probabilità e la velocità di una o più di queste trasformazioni, così come potrebbe ridurla l'abbandono degli stessi, l'atto diagnostico ed al tempo stesso terapeutico, l'utilizzo di fattori promuoventi la differenziazione cellulare.

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.

STORIA NATURALE DEI CARCINOMI DELLA 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 adenocarcinoma³⁸.

Macroscopicamente, la neoplasia può presentare carattere vegetante, con aspetto a cavolfiore, facilmente sanguinante, o infiltrativo, 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%. In realtà al momento della diagnosi, le localizzazioni «transglottiche», con interessamento contemporaneo dei tre piani, sono circa un terzo dei casi⁴³.

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 cartilagine¹⁴. Altre importanti barriere anatomiche all'evoluzione extralaringea della malattia sono rappresentate dalla membrana jo-epiglottica, e la membrana tiroioidea, rispettivamente tetto e parete anteriore della loggia jo-tiro-epiglottica.

Nell'ambito della laringe esistono, poi, punti di minore resistenza quali:

- la commessura anteriore, in corrispondenza del punto di inserzione del tendine di Broyles, privo di pericondrio, con possibilità di passaggio di cellule neoplastiche verso la zona prelaringea o la sottoglottide;
- membrana cricotiroidea, attraverso la quale si può verificare una diffusione extralaringea di tumori a sede sottoglottica;
- epiglottide, i cui orifizi cribriiformi possono favorire l'estensione del processo neoplastico verso la loggia jo-tiro-epiglottica;
- spazio paraglottico, via privilegiata di progressione di tumori della zona sovraglottica verso la sottoglottide.

Sottosede sovraglottica

La localizzazione alla zona vestibolare si osserva nel 35-40% dei casi. La via di diffusione prevalente è quella anteriore, verso lo spazio jo-tiro-epiglottico, compreso tra la faccia anteriore dell'epiglottide e la membrana tiro-ioidea, chiuso in alto dalla membrana jo-epiglottica. Questa prevalente modalità di diffusione è giustificata, in primo luogo, dal fatto che la maggior parte di queste neoplasie insorge nella parte anteriore della zona vestibolare, all'unione delle false corde con il piede dell'epiglottide. In secondo luogo non esistono anteriormente barriere anatomiche, ad eccezione dell'esile legamento tiro-epiglottico mediano, che si oppongono alla progressione in profondità del processo neoplastico. Dallo spazio jo-tiro-epiglottico il tumore, progredendo verso l'alto, può invadere la base della lingua⁵.

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. In altri casi il tumore può portarsi in alto ed in avanti, decorrere lungo il margine laterale dell'epiglottide, superare la membrana jo-epiglottica e raggiungere le pliche faringo-epiglottiche e la base della lingua.

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. Nella sua progressione, il processo neoplastico può invadere lo spazio jo-tiro-epiglottico e, inferiormente, la corda vocale e la regione sottoglottica (carcinomi transglottici).

Sottosede glottica

I carcinomi della zona cordale costituiscono circa il 25% dei tumori maligni laringei; la localizzazione più frequente corrisponde al bordo libero della corda vocale vera¹.

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. Inoltre, la malattia può esteriorizzarsi a livello sottocutaneo, dopo aver perforato lo scudo tiroideo.

Sottosede 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 ⁵⁰.

Discorso a parte meritano i carcinomi laringei 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.

Più raramente questi tumori insorgono a livello della regione aritenoidea o sul margine libero delle pliche ari-epiglottiche, con possibile estensione verso la laringe o l'ipofaringe.

Il sistema linfatico laringeo è formato da due reti vasali, una disposta superficialmente, nella tonaca propria, ed una più profonda, con vasi di calibro superiore, sita nella sottomucosa, tra loro ampiamente connesse. Da queste due reti si dipartono due gruppi principali di collettori: quelli della rete sopraglottica e quelli della rete sottoglottica, tra loro in comunicazione a livello glottico e soprattutto lungo la parete posteriore della laringe. La regione cordale o glottica non ha collettori propri: i fini e scarsi capillari del labbro vocale drenano la linfa nei linfatici sopraglottici e più raramente in quelli della regione sottoglottica ⁶⁶.

I tronchi linfatici provenienti dalla regione sopraglottica, seguendo il decorso dell'arteria laringea superiore, si uniscono a quelli dell'ipofaringe e terminano nei linfonodi giugulo-carotidei superiori e medi.

Viceversa, i collettori provenienti dalla regione sottoglottica formano tre peduncoli: uno anteriore che attraverso la membrana crico-tiroidea e in parte con l'interposizione dei linfonodi pre-laringei e pre-tracheali, raggiunge le linfoghiandole giugulo-carotidiche medie ed inferiori; due posteriori che attraversano il legamento crico-tracheale e, mediante l'interposizione dei linfonodi paratracheali, raggiungono i linfonodi giugulo-carotidei inferiori e ricorrentiali.

È stata dimostrata la connessione tra le reti linfatiche delle emilaringi, sia a livello sopraglottico che sottoglottico, con possibilità, pertanto, di metastasi contralaterali.

Questi dati giustificano la disposizione topografica delle metastasi linfonodali, in rapporto alla sede della neoplasia. L'incidenza con cui esse si manifestano in caso di carcinoma cordale puro è pari al 6%; sono, invece, molto frequenti e precoci nei tumori maligni transglottici (33% dei casi) e nei carcinomi sopraglottici (55% dei casi)

Pertanto, la diffusione linfatica di un tumore laringeo, dai linfonodi regionali di prima barriera situati agli illi vascolari alle stazioni linfonodali del collo, avviene in modo prevedibile e sequenziale ai livelli II, III, IV e talvolta V: va da sé che stadi avanzati e localizzazioni basse, ipoglottiche, comportano una diffusione anomala, per sovvertimento del circolo linfatico e venoso ⁶⁷.

Inoltre, l'indice dei falsi negativi (linfonodi N0 clinici ma N+ patologici) è valutabile fra il 20-48%, a seconda delle casistiche ⁵⁶. Malgrado la percentuale non trascurabile di errore, il dato clinico di adenopatia palpabile mantiene intatto il proprio significato prognostico negativo.

La percentuale di metastasi a distanza è valutabile nell'ordine del 5-10% dei casi, con rilievi a livello polmonare, osseo ed epatico. Le metastasi sembrano meno frequenti in caso di lesione sovraglottica. Inoltre, è stato riscontrato che in oltre il 50% dei casi le metastasi a distanza si associano a ripresa di malattia in sede loco-regionale⁶⁷.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ American Joint Committee on Cancer. *Report of cancer survival and end results. In Manual for staging of cancer, 3rd Ed.* Philadelphia: JB Lippincott 1988:13-20.
- ² Anneroth G, Batsakis J, Luna M. *Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinoma.* Scand J Dent Res 1987;95:229-49.
- ³ Auerbach O, Hammond EC, Garfinkel L. *Histologic changes in the larynx in relation to smoking habits.* Cancer 1970;25:92-104.
- ⁴ Baclesse F. *Les cancers du rhinopharynx. Étude radiographique. Résultats éloignés par la radiothérapie.* Ann Oto-Laryngol 1956;78:509-20.
- ⁵ 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 advances 1987:12-24.
- ⁶ Biller H, Davis W, Ogura J. *Delayed contralateral cervical metastasis with laryngeal and laryngopharyngeal cancers.* Laryngoscope 1971;81:1499-502.
- ⁷ Bocca E. *Attuali orientamenti di strategia terapeutica nel cancro glottico e sottoglottico.* In: Serafini I, ed. *Il carcinoma glottico e sottoglottico.* Atti «Giornate vittoriesi di laringologia» Ed. Piccin 1989.
- ⁸ Bohorquez JF. *The influence of the relationship «Local tumor extent-time» upon the evolution of tumors of the nasopharynx.* Am J Roentgenol 1969;105:536-49.
- ⁹ Bouaziz A, Chabardes E, Laccoureye O, Menare M, Brasnu D, Laccoureye H. *Extension à la fosse infra-temporale des tumeurs malignes du massif facial.* Ann Otolaryngol Chir Cervicofac 1991;108:113-8.
- ¹⁰ Brugère J, Eschwège F, Schwaab G, Micheau C, Cachin Y. *Les carcinomas du nasopharynx (cavum): aspects cliniques et évolutifs.* Cancer 1975;62:319-30.
- ¹¹ Cantù G, Solero CL, Mariani L, Mattavelli F, Pizzi N, Licitra L. *A new classification for malignant tumors involving the anterior skull base.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1999;125:1252-7.
- ¹² Carpenter R III, De Santo L. *Cancer of the hypopharynx.* Surg Clin North Am 1977;57:7-23.
- ¹³ Choa G. *Nasopharyngeal carcinoma.* J Laryngol Otol 1974;88:145-58.
- ¹⁴ Cortesina G. *Altre osservazioni critiche sulla classificazione TNM dei tumori maligni cervico-cefalici.* Riunione di Aggiornamento LXXXV Congr Nazion SIO Acta Otorhinol Ital 1988;8:312-70.
- ¹⁵ 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.
- ¹⁶ Cortesina G, Sacchi M, Cavalot AL, Carlevato MT, Gervasio CF. *Epidemiologia, fattori di rischio, carcinogenesi e storia naturale.* In: *Il carcinoma iniziale del distretto cervico-cefalico.* Torino: Early cancers 1993:9-29.
- ¹⁷ Cunnigham MP, Cattin D. *Cancer of the pharyngeal wall.* Cancer 1967;20:1859-66.
- ¹⁸ Campora E. *I tumori epiteliali maligni del cavo orale.* Rel. Uff. LXXXVII, Cagliari, Maggio 2000.
- ¹⁹ Dickson RI. *Nasopharyngeal carcinoma: an evaluation of 209 patients.* Laryngoscope 1981;91:333-54.
- ²⁰ Don DM, Anzai Y, Lufkin RB. *Evaluation of cervical lymph node metastases in squamous cell carcinoma of the head and neck.* Laryngoscope 1995;105:669-74.
- ²¹ Ellouz R, Ben Attia A, Cammoun M, Maalej M, Jellouli M, Ladgham A, et al. *Le cancer du cavum en Tunisie.* XV^{ème} Congrès Médical Maghrébin, Institut Salah Azaiz, Tunisi, 1986.
- ²² Facchetti F, Antonelli AR, Nicolai P. *Correlazioni clinico-patologiche.* In: Rel. Uff. I tumori maligni dei seni paranasali. LXXXII Congr. Naz. Viterbo Maggio 1995:106-222.
- ²³ Fletcher GH, Million RR. *Malignant tumors of the nasopharynx.* Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med 1965:93-47.

- 24 Franceschi D, Gupta R, Spiro RH, Shah JP. *Improved survival in the treatment of squamous carcinoma of oral tongue*. Am J Surg 1993;166:360-5.
- 25 Fleming JAC. *Carcinoma of the thoracic oesophagus. Some notes on its pathology and spread in relation to treatment*. Br J Radiol 1943;16:212-6.
- 26 Fleming JAC. *Radiotherapy in cancer of the thoracic oesophagus*. Thorax 1947;2:206-15.
- 27 Garrett P, Beale F, Cummings B. *Cancer of the tonsil. Results of radical radiation therapy with surgery in severe*. Am J Surg, 1983;116:432-5.
- 28 Gelinas M, Fletcher GH. *Incidence and causes of local failure of irradiation in squamous cell carcinoma of the faucial arch, tonsillar fossa and base of the tongue*. Radiology 1973;108:383-7.
- 29 Givens CD Jr, Johns ME, Cantrell RW. *Carcinoma of the tonsil. Analysis of 162 cases*. Arch Otolaryngol 1981;107:730-4.
- 30 Gluckman JL, Pavelic ZP, Welkoborsky HJ, Mann W, Stambrook P, Gleich L, et al. *Prognostic indicators for squamous cell carcinoma of the oral cavity: a clinicopathologic correlation*. Laryngoscope 1997;107:1239-44.
- 31 Guillaumondegui OM, Meoz R, Jesse RH. *Surgical treatment of squamous cell carcinoma of the pharyngeal walls*. Am J Surg 1978;136:474-6.
- 32 Harrison D. *Pathology of the hypopharyngeal cancer in relation to surgical management*. J Laryngol Otol 1970;84:349-67.
- 33 Hellquist H, Olofsson J, Grontoft O. *Carcinoma in situ and severe dysplasia of the vocal cords*. Acta Otolaryngol 1981;92:543-55.
- 34 Hellquist H. *Pre-invasive lesions of the upper aerodigestive tract: histologic definitions and clinical implications*. Pathol Ann 1987;31:311-52.
- 35 Hoffman HT, Karnell LH, Shah JP, Ariyon S, Stephen Brown G, Fee WE, et al. *Hypopharyngeal cancer patient: care evaluation*. Laryngoscope 1997;107:1005-17.
- 36 Hsu MM, Tu SM. *Nasopharyngeal carcinoma in taiwan. Clinical manifestations and results of therapy*. Cancer 1983;52:362-8.
- 37 Inoue T, Shigematsu Y, Sato T. *Treatment of carcinoma of the hypopharynx*. Cancer 1973;31:649-55.
- 38 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.
- 39 Khor Th, Tan BC, Chua EJ, Chia KB. *Distant metastasis in nasopharyngeal carcinoma*. Clin Radiol 1978;29:27-30.
- 40 Kirchner JA. *Pyiform sinus cancer: a clinical and laboratory study*. Ann Oto-Laryngol 1975;84:793-803.
- 41 Kirchner J, Owen J. *Five hundred cancers of the larynx and pyriform sinus*. Laryngoscope 1977;87:1288-303.
- 42 Kondo M, Ogawa K, Inuyama Y, Yamashita S, Tominaga S, Shigematsu N, et al. *Prognostic factors influencing the relapse of squamous cell carcinoma of maxillary sinus*. Cancer 1985;55:190-6.
- 43 Kurita S, Hirano M, Matsuoka H, Tateishi M, Sato K. *A histopathological study of carcinoma of the larynx*. Auris Nasus Larynx 1985;12:173-4.
- 44 Lefebvre JL, Madelain M, Adenis L, Demaille MC, Delobelle A, Demaille A. *Les épithéliomas nasopharyngéens: expérience du centre Régional de Lutte contre le cancer de Lille (79 cas de 1970 à 1982)*. Cancer 1983;70:294-9.
- 45 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.
- 46 Li XM, Wei WI, Guo XF, Yuen PW, Lam LK. *Cervical lymph node metastatic patterns of squamous carcinoma in the upper aerodigestive tract*. J Laryngol Otol 1996;110:937-41.
- 47 Lindberg R. *Distribution of cervical lymph nodes from squamous cell carcinoma of upper respiratory and digestive tracts*. Cancer 1972;29:1446-9.
- 48 Lindberg R, Jesse RH, Fletcher GH. *Radiotherapy before or after surgery? In: Neoplasia of head and neck*. Chicago: Year Book Medical Publishers 1974:47-85.
- 49 Maher WP. *Arterial venous and lymphatic pathways intrinsic to the palate and fauces (implicated routes for metastatic lesions)*.
- 50 McGuirt WF, Ray M. *Second laryngeal cancers in previously treated larynges*. Laryngoscope 1999;109:1406-8.

- 51 Million RR, Cassisi NJ. *Management of head and neck cancer*. Chapter 19: Larynx. Philadelphia: JB Lippincot Co. 1984.
- 52 Million RR, Cassisi NJ. *Management of head and neck cancer: a multidisciplinary approach*. Philadelphia: Second Ed. JB Lippincott Company 1994.
- 53 Molinari R, Grandi C, Boracchi P, Mezzanotte G, Marubini E. *Prognostic factors in nasopharyngeal carcinoma. Uni-and multivariate analysis of 410 cases from a multicentric study*. Proc. II Arlington USA: Internat Head Neck Oncol Res Conf 1987:495-504.
- 54 Morrison AS. *Early lesions and stages suitable for prevention: hyperplasia, mild, medium, severe dysplasia, ca in situ*. In: *Perspectives on secondary prevention of laryngeal cancer*. Torino: International Workshop 1993:28-30.
- 55 Morson BC, Dawson IMP, Spriggs AI. *Gastrointestinal pathology*. 2nd Ed., Oxford: Blackwell Scientific 1979:3-7,33-57.
- 56 Myers EN. *Radical neck dissection in laryngeal cancer*. In: *Attualità in tema di carcinoma laringeo*. Ed. A. di Girolamo 1989.
- 57 Myers EN, Suen JY. *Perspectives on cancer of the head and neck. Cancer of the head and neck*. Second Edition, 1982:5-8.
- 58 Müller Hermelink HK. *Is carcinoma in situ really a malignant lesion?* In: *Perspectives on secondary prevention of laryngeal cancer*. Torino: International Workshop 1993:36-7.
- 59 Ogura J, Biller H, Wette R. *Elective neck dissection for pharyngeal and laryngeal cancers*. Ann Otol Rhinol Laryngol 1971;80:646-50.
- 60 Oliver AJ, Helfrick JF, Gard AD. *Primary oral squamous cell carcinoma: a review of 32 cases*. J Oral Maxillofac Surg 1996;54:949-54.
- 61 Oreggia F, De Stefani E, Deneo-Pellegrini H, Olivera L. *Carcinoma of the tonsil. A retrospective analysis of prognostic factors*. Arch Otolaryngol 1983;109:305-9.
- 62 Perez CA, Lee FA, Ackerman LV, Ogura JH, Powers WE. *Non-randomized comparison of preoperative irradiation and surgery versus irradiation alone in management of carcinoma of the tonsil*. Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med 1976;126:248-60.
- 63 Perez CA, Purdy JA. *Carcinoma of the tonsillar fossa*. Cancer 1982;50:2314-22.
- 64 Petrovich Z, Cox JD, Middleton R, Ohanian M, Paig C, Jepson J. *Advanced carcinoma of the nasopharynx. Pattern of failure in 256 patients*. Radiotherapy Oncology 1985;4:15-20.
- 65 Pillsbury HC, Clark M. *A rationale for therapy of the N0 neck*. Laryngoscope 1997;107:1249-315.
- 66 Piquet JJ, Chevalier D. *Adenopathies cervicales*. Encycl Med Chir (Paris, France), Oto-Rhino-Laryngologie 20870 A10,6-1990.
- 67 Robbins KT, Medina JE, Wolfe GT, Levine PA, Session RB, Pruet CW. *Unificazione della terminologia riguardante la dissezione cervicale: rapporto ufficiale del Comitato Accademico per la Chirurgia oncologica Cervico-cefalica*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1991;117:601-5.
- 68 Rosenberg JC, Schwade JG, Vaitkevicius VK. *Cancer of the oesophagus*. In: De Vi, Ed. *Cancer Principales and Practice of Oncology*. Philadelphia: JB Lippincott 1982:499-533.
- 69 Ross GL, Shoab T, Soutar DS, MacDonald DG, Camilleri IG, Bessent RG, et al. *The First International Conference on sentinel node biopsy in mucosal head and neck cancer and adoption of a multicenter trial protocol*. Ann Surg Oncol 2002;9:406-10.
- 70 Sartoris A, Giordano C, Succo G, Segnan N. *Perspectives on secondary prevention of laryngeal cancer*. International Workshop 1993.
- 71 Scanlon P, Rhodes R, Woolner L, Devine K, McBean J. *Cancer of the nasopharynx. 142 patients treated in the 11 year period 1950-1960*. Am J Roentgenol 1967;99:313-25.
- 72 Schwaab B, Brugere J, Lefbvre JM. *Tumours of the nasal cavities and paranasal sinuses. An analysis of 746 patients treated over a 10 year period*. 60. Abstracts Book. Third International Conference on Head and Neck Cancer, San Francisco 1992.
- 73 Schwaab G, Julieron M, Jenet F. *Epidemiology of cancers of the nasal cavities and paranasal sinuses*. Neurochirurgie 1997;43:61-3.
- 74 Schwaab G, Mamelle G, Zbaren P, Marandas P, Domenge C, Eschwewege F. *Cancers of the upper face. The experience of the Gustave Roussy Institute. A propos of 162 cases (1965-1980)*. Ann Otolaryngol Chir Cervicofac 1988;105:173-8.
- 75 Shah JP, Kraus DH, Arbit E, Galicich JH, Strong EW. *Craniofacial resection for tumors involving the anterior skull base*. Otolaryngology Head Neck Surg 1992;106:387-93.

- ⁷⁶ Snow GB, van den Brekel MW, Leemans CR, Patel R. *Surgical management of cervical lymph nodes in patients with oral and oropharyngeal cancer*. *Recent Results Cancer Res* 1994;134:43-55.
- ⁷⁷ 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 Otorhinolaryngologica Italica* 1998;3:281-97.
- ⁷⁸ Steel PM, Gupia SK. *Surgical treatment of oropharyngeal carcinomas*. *J Laryngol Otol* 1980;94:95-102.
- ⁷⁹ Steiner W. *Prevention and early detection of cancer of the upper aerodigestive tract. Results of endoscopic mass screening*. In: Wigand ME, Steiner W, Stell PM, eds. *Functional partial laryngectomy*. Berlin: Springer-Verlag 1984:44-8.
- ⁸⁰ 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 laryngeal precancerous lesions*. *Cancer J* 1994;1:20-4.
- ⁸¹ Thawley SE, Panje WR, Batsakis JG, Linderberg RD. *Controversies in multimodality therapy for head and neck cancer: clinical and biological perspectives*. In: Collins SL, ed. *Comprehensive management of head and neck tumors. Second Ed*. WB Saunders Company 1999.
- ⁸² Thompson DT. *Lower tracheal and carinal resection associated with subtotal oesophagectomy for carcinoma of oesophagus involving trachea*. *Thorax* 1973;28:257-60.
- ⁸³ Tong D, Laramore G, Griffin WT. *Carcinoma of tonsillar region*. *Cancer* 1982;49:2009-14.
- ⁸⁴ Van der Brekel MW, Castelijns JA, Stel HV. *Occult metastatic neck disease: detection with us and us-guided fine-needle aspiration cytology*. *Radiology* 1991;180:457-61.
- ⁸⁵ Wang CC. *Management and prognosis of squamous cell carcinoma of the tonsillar region*. *Radiology* 1972;104:667-71.
- ⁸⁶ Watson JC, Ridge JA. *Surgical management of local and regional recurrent head and neck squamous cell carcinoma*. *Curr Opin Oncol* 1998;10:207-12.

II. METODOLOGIE STATISTICHE PER LO STUDIO DEI FATTORI PROGNOSTICI DEI TUMORI DELLA TESTA E DEL COLLO

R. Albera, T. Martone, F. Palonta, G. Cortesina

INTRODUZIONE

La statistica è uno strumento che consente di raccogliere e analizzare dati per ricavarne delle conclusioni. In particolare la statistica descrittiva si occupa di sintetizzare in pochi numeri, ma informativi, i dati ottenibili da un esperimento o da un'indagine, mentre la statistica inferenziale permette di trarre delle conclusioni di tipo generale partendo da osservazioni sperimentali necessariamente limitate. Le metodologie di statistica inferenziale sono le più interessanti per i ricercatori, che di norma agiscono in condizioni limitate di tempo, spazio e risorse ma con l'obiettivo di ottenere dalla loro sperimentazione risultati applicabili su tutta la popolazione.

Mantenendo la suddivisione in statistica descrittiva ed inferenziale, nel presente capitolo ci limiteremo a fornire alcune informazioni di base che consentano di far comprendere le motivazioni della scelta ed il significato dei test statistici comunemente utilizzati in ambito oncologico. Per quanto riguarda i concetti matematici alla loro base e le modalità di calcolo si rimanda a pubblicazioni specifiche o ai softwares dedicati a tale proposito.

MODALITÀ DI SCELTA DEL CAMPIONE

Il primo passo di ogni studio scientifico basato sull'analisi statistica è costituito dalla necessità di definire un campione da esaminare che possa essere considerato rappresentativo della popolazione che interessa studiare.

Con il termine di «campione» si intende un insieme di osservazioni individuali eseguite su un numero limitato di soggetti, ad esempio 100 soggetti affetti da neoplasia laringea.

Con il termine di «popolazione» si intende, viceversa, la totalità delle possibili osservazioni individuali che si desidera analizzare attraverso il campione, ad esempio tutti i soggetti affetti da tumore della laringe. In pratica, con i dati ottenuti mediante gli strumenti statistici sul campione esaminato si cerca di definire l'andamento del fenomeno nell'intera popolazione.

Il campione deve essere rappresentativo della popolazione e quindi deve essere scelto in modo da essere omogeneo rispetto al parametro che si intende studiare.

Per aumentare la rappresentatività del campione occorre che tutte le possibili osservazioni individuali di una popolazione abbiano la stessa probabilità di essere presenti nel campione stesso. Ciò è possibile mediante la randomizzazione del campione, cioè mediante la scelta casuale delle osservazioni. La randomizzazione è estremamente importante se si deve valutare l'efficacia di un trattamento rispetto ad un altro; l'inserimento casuale di ogni individuo in uno dei diversi bracci terapeutici è l'unico strumento che consente di confrontare i risultati ottenuti con protocolli terapeutici differenti al fine di trarre delle conclusioni non influenzate da fattori soggettivi.

Un elemento cruciale per ogni studio statistico è rappresentato dalle dimensioni del campione. Infatti per valutare l'efficacia di un farmaco o di un intervento o l'utilità di un fattore prognostico è necessario raggiungere un numero tale di osservazioni che consenta di definire se la differenza tra i dati ottenuti sia significativa o meno.

A questo proposito deve essere introdotto il significato di potenza di un test statistico. Per potenza di un test si intende la sua capacità nell'evidenziare una differenza statisticamente significativa quando il trattamento produce realmente un effetto o quando il fattore prognostico è indicativo di un certo comportamento della neoplasia (vero positivo). Una potenza pari a 0.55 indica che vi è una probabilità del 55% di evidenziare come statisticamente significativo un effetto che esiste realmente.

La potenza di un test in un determinato esperimento è data da:

- il rischio che si intende accettare di commettere un errore di tipo I, cioè di definire come inefficace un trattamento che, invece, è efficace;
- il più piccolo effetto che ha senso rilevare (più è piccolo tale valore più il risultato sarà significativo ma più grande è il rischio di accettare come normali dati che sono patologici, con conseguente diminuzione della potenza del test);
- la numerosità campionaria.

Per definire a priori il numero di casi da inserire esistono formule matematiche che si basano sulla differenza attesa tra i diversi campioni in esame o sulla minima differenza che riteniamo essere necessaria tra due gruppi (ad esempio definire se una certa terapia è in grado di abbassare la mortalità di almeno il 10%); ovviamente tali parametri devono essere noti o ipotizzati prima dell'esecuzione dello studio.

In alternativa è possibile seguire due differenti procedure:

1. si eseguono osservazioni su un certo numero di casi, ad esempio su tutti i malati a disposizione in un certo periodo, e si controlla alla fine se si ottiene o meno una differenza significativa; in questo modo si possono ottenere informazioni di tipo statistico conclusive nell'ambito del campione studiato ma che non sono necessariamente riconducibili in senso generale a tutta la popolazione;

2. proseguire l'esperimento fino al momento in cui sia raggiunto un risultato significativo (sperimentazione sequenziale).

STATISTICA DESCRITTIVA

È costituita dai metodi più semplici di analisi statistica. Essi consentono di riassumere i dati raccolti in una singola variabile in modo da descrivere la popolazione osservata mediante il campione.

Media: è costituita dalla somma dei valori di ogni elemento della popolazione diviso per il numero degli elementi della popolazione.

Moda: è il valore più frequentemente rilevato nel campione.

Mediana: è quel valore centrale della variabile per cui i valori osservati sono per metà più grandi e per metà più piccoli.

Percentili: rappresentano i valori rilevati in una certa percentuale dei casi esaminati; solitamente si fa riferimento ai valori al 25°, 50°, 75°, 90° e 95° percentile. Ad esempio se si vuole valutare l'altezza dei soggetti maschi alla visita di leva, il 25° percentile (ad es. m 1,60) comprende le misure di altezza del 25% dei soggetti più bassi; viceversa il 95° percentile sarà rappresentato da un valore elevato di altezza (ad es. m 1,90) entro il quale si collocano il 95% dei soggetti ed oltre il quale verranno trovati solo più pochi soggetti (5%). Il 50° percentile corrisponde alla mediana.

Range: è costituito dall'intervallo compreso tra il valore minimo ed il valore massimo rilevato nel campione. Non può essere considerato come un buon indicatore della dispersione dei dati in quanto esprime solo i valori estremi (massimo e minimo) che potrebbero essere poco significativi (ad esempio considerare la presenza di un nano e di un gigante nella descrizione dell'altezza di una popolazione). Il range appare utile soprattutto quando si vuole descrivere il campione esaminato a livello informativo, senza poi utilizzare tale parametro per altre valutazioni statistiche (ad esempio il range di età del campione riportato solitamente nei materiali e metodi).

Varianza: rappresenta uno strumento di misura della dispersione dei dati intorno alla media più preciso del range in quanto tiene in considerazione lo scostamento di tutti i valori ottenuti rispetto al valor medio. La varianza è data dalla somma del quadrato degli scostamenti dei valori osservati dal valore medio diviso per il numero delle osservazioni eseguite; poiché rispetto al valore medio lo scostamento sarà positivo (cioè superiore al valore medio) nella metà circa dei casi e negativo nella restante metà circa, il risultato potrebbe porsi molto vicino allo 0, quindi poco utile; ne consegue la necessità di elevare al quadrato il valore di scostamento della media al fine di ottenere tutti numeri positivi. Un elevato valore di varianza dimostra una notevole dispersione dei dati. La varianza è lo strumento di base per il calcolo di buona parte dei test statistici parametrici utilizzati nel calcolo della probabilità.

Deviazione standard: è data dalla radice quadrata della varianza. In caso di distribuzione normale dei dati esprime il range all'interno del quale si ritrovano il 67% dei valori ottenuti (ad esempio se la media di una certa misurazione è 100 e la deviazione standard è 10, il 68% dei valori ottenuti è compreso tra 110 e 90). Il range compreso tra la media più-meno due deviazioni standard contiene il 95% dei dati rilevati, mentre il range compreso entro tre deviazioni standard contiene il 99% dei dati.

Distribuzione normale dei dati: si definisce normale, o gaussiana, una distribuzione di dati in cui i 2/3 dei valori registrati rientrano in un range definito dal valore medio più-meno una deviazione standard. Nella distribuzione normale:

– la moda deve essere pari, o comunque molto prossima, al valore medio (ad esempio se l'altezza media di un campione è m 1,70 questo deve essere il valore più frequentemente registrato);

- media e mediana debbono essere simili;
- il numero di casi che si discostano di un certo valore da quello medio deve essere uguale ai due lati del valore medio (nell'esempio precedente il numero di soggetti alti 1,60 e 1,80 deve essere uguale).

Questa distribuzione dei dati può essere disegnata mediante una curva posta su assi cartesiani ed in cui sull'asse delle x sia riportato il valore del parametro esaminato (ad es. età, altezza, dimensioni della neoplasia, ecc.) e su quello delle y il numero di casi rilevati (Fig. 1).

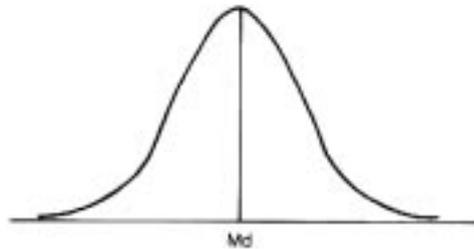


Fig. 1.

Esempio di distribuzione gaussiana dei dati intorno al valore medio.

In una distribuzione normale il campione è completamente definito dal valore medio e della deviazione standard. Tanto più il campione è numeroso tanto maggiore è la probabilità che segua una distribuzione gaussiana. Se la distribuzione è normale nel confronto tra campioni diversi sarà possibile applicare test parametrici, altrimenti sarà necessario utilizzare test non parametrici. Esistono test statistici all'interno dei softwares che consentono di definire se la distribuzione possa essere considerata normale o meno. È ovvio che tale valutazione deve essere fatta prima di ogni altra valutazione statistica al fine di definire quale tipo di test utilizzare (parametrico o non).

STATISTICA INFERENZIALE

I metodi statistici utilizzati sono denominati test di significatività e consentono di determinare il valore di «p».

Per comprendere il significato di «p» è necessario ricordare che si parte dal principio che due popolazioni abbiano le stesse caratteristiche, o due trattamenti sortiscano lo stesso effetto. Tale ipotesi è definita come «nulla» ed il valore di «p» non è significativo. Viceversa se il valore di «p» è significativo è ipotizzabile che le due popolazioni siano realmente differenti o che le due terapie abbiano diversa efficacia.

Il valore di «p» viene espresso in termini percentuali per cui aver ottenuto un

valore di $p < 0,05$ significa che vi è meno del 5% di probabilità di sbagliare affermando che la differenza tra le osservazioni sia reale e non casuale.

Ad esempio nella valutazione dell'efficacia di due farmaci nella riduzione della massa neoplastica, aver ottenuto un valore di $p < 0,05$ indica che tra tutti i possibili campioni confrontabili in una popolazione affetta da un certo tumore vi è una sola probabilità su 20 che i due campioni siano identici e che, di conseguenza l'effetto dei due farmaci sia simile; in questo caso può essere rigettata l'ipotesi nulla ed è possibile affermare che l'efficacia dei due farmaci è realmente differente.

Il valore di 0,05 viene comunemente definito quale limite di significatività. Ovviamente tanto più il valore di «p» è piccolo (0,01, 0,005, 0,001, ecc.) tanto più elevata sarà la probabilità che la differenza rilevata tra due campioni sia reale e non casuale.

Nella parte successiva verranno analizzati i più comuni test statistici di tipo inferenziale e basati sulla determinazione di «p», suddividendoli in parametrici e non parametrici.

TEST PARAMETRICI

T test di Student: rappresenta certamente il test più noto ed utilizzato; consente di confrontare due campioni al fine di confermare o meno l'ipotesi che i due campioni, definiti da media e deviazione standard, provengano dalla stessa popolazione (ipotesi nulla). Un basso valore di p (solitamente $p < 0,05$) non verifica l'ipotesi nulla per cui vi è un'elevata probabilità che i soggetti contenuti nei due campioni provengano da due popolazioni differenti. Questo test può essere applicato nell'analisi di variabili misurate in scale o intervalli, ad esempio centimetri, anni, ecc.

T test per dati appaiati: in questo caso l'analisi viene eseguita sui dati rilevati sullo stesso soggetto; il test consente di definire, ad esempio, se in uno stesso campione la massa neoplastica si è significativamente ridotta dopo la terapia nei singoli soggetti inseriti nel campione stesso.

Test della varianza: è un test con significato simile al t test di Student ma applicabile nel caso in cui si debbano confrontare più di due campioni. Un valore di $p < 0,05$ indica che almeno uno dei campioni inseriti nello studio si differenzia dagli altri ma non quale; per definire quale (o quali) tra i campioni considerati si differenzia dagli altri si possono utilizzare altri test quali il test di Bonferroni o di Student-Neumann-Keuls. Come per il t test di Student, il test della varianza può essere utilizzato in presenza di variabili misurate in scale o intervalli.

Chi quadrato: nel caso in cui vengano trattate variabili di tipo nominale (cioè non in scale o intervalli come nei casi precedenti) si debbono utilizzare test che consentono di eseguire la valutazione su tassi e proporzioni. Variabili nominali sono quelle riconducibili a due possibili differenziazioni del campione (ad esempio maschio-femmina, vivo-morto, ecc.). Esistono semplici test statistici che possono essere impiegati in presenza di un campione in cui vi siano solo due possibili esiti (definire se vi è una differenza statisticamente significativa all'interno di un campione tra la percentuale di casi in cui si è verificato un evento rispetto ad un altro, ad esempio la percentuale di casi in cui il tumore si è ridotto rispetto a quella in cui non si è modificato). Tuttavia il test sicuramente più noto ed utilizzato è il chi-quadro, che

Tab. I.

Esempio di tabella di contingenza 2x2.

	Risposta positiva	Risposta negativa
Maschi	18	7
Femmine	6	13

può essere utilizzato nel caso in cui sia necessario confrontare più campioni o in cui vi siano più di due esiti possibili (ad esempio definire se la percentuale di casi in cui il tumore si è ridotto grazie ad una determinata terapia sia significativamente diversa nei due sessi). Il test si basa sull'analisi delle tabelle di contingenza, in cui vengono riportati i numeri (e non le percentuali) dei casi riscontrati in ogni sottogruppo. La Tabella I si riferisce alla costruzione di una tabella di contingenza 2x2 in cui vengono confrontati i numeri di risposta positiva o negativa del tumore ad una certa terapia, nei due sessi:

Il valore di p esprime la significatività della differenza nei due campioni.

Nel caso in cui il campione sia costituito da un basso numero di casi, in genere 20 o meno, è più opportuno utilizzare il test esatto di Fischer in luogo del test del chi quadro.

Tests di correlazione: il coefficiente di correlazione del momento-prodotto di Pearson e le rette di regressione: tali tests consentono di definire se esista un rapporto non casuale tra due variabili, ad esempio se vi è una relazione tra il numero di sigarette fumate e la quantità di P53 rilevata.

La correlazione può essere definita matematicamente mediante una retta di regressione, che consente di definire in quale misura una variabile (detta dipendente) tenda a crescere, o a diminuire, al modificarsi dell'altra variabile (detta indipendente).

Il coefficiente di correlazione è espresso in termini di « r » e « p » ed esprime il grado di probabilità che esista una correlazione tra i due parametri. Il valore di « r » è compreso tra -1 e +1; tanto più è stretta la correlazione tra due parametri tanto più il valore di « r » si avvicina a 1, mentre valori vicini allo 0 indicano una debole, o nulla, correlazione; valori negativi di « r » indicano una correlazione inversa, come nel caso in cui al crescere di un parametro si verifichi il diminuire dell'altro (ad esempio con l'aumentare della dose di chemioterapico diminuisce la massa neoplastica).

La retta di regressione è descritta dai valori di intercetta e di inclinazione che consentono di disegnarne l'andamento su un sistema di assi cartesiani. La retta di regressione rappresenta la migliore tra quelle possibili nel descrivere la relazione tra le due variabili; geometricamente essa corrisponde alla retta che rende minima la variabilità totale tra i dati osservati e la retta stessa (Fig. 2).

In alcuni casi è ipotizzabile che la correlazione tra due parametri non segua una relazione lineare per cui si dovranno disegnare curve di correlazione ad andamento esponenziale, logaritmico, ecc.

Calcolo delle curve di sopravvivenza: rappresenta certamente la metodologia statistica più in uso in ambito oncologico.

Accanto a calcoli relativamente semplici di sopravvivenza reale, descritta dalla

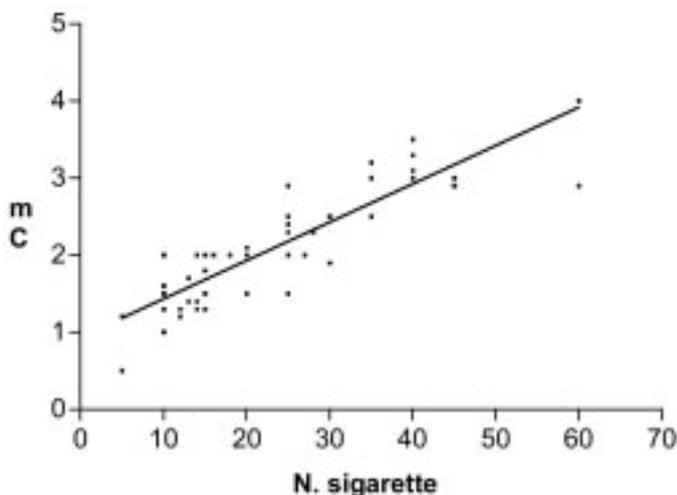


Fig. 2.

Regressione lineare in un ipotetico studio di correlazione tra numero di sigarette fumate e dimensioni della neoplasia (in cm). Sull'asse delle x è riportato il numero di sigarette fumate, su quello delle y la dimensione del tumore. I quadratini neri corrispondono alle singole rilevazioni. La retta disegnata è quella che rende minima la differenza tra i dati rilevati e la retta stessa. La formula matematica che consente di disegnare la retta è $y = 0,05x + 1$, in cui 0,05 descrive l'inclinazione della retta e 1 il valore di y nel punto in cui la retta intercutta l'asse delle y. La correlazione tra i due parametri è altamente significativa ($p < 0.0001$). L'esperimento dimostra una correlazione statisticamente significativa tra numero di sigarette fumate e dimensioni della neoplasia.

percentuale di soggetti vivi o liberi da malattia ad una certa distanza di tempo dall'inizio dello studio (ad esempio se su 100 affetti da carcinoma laringeo 90 sono vivi dopo 5 anni la percentuale di sopravvivenza è del 90%), esistono test attuariali che forniscono indicazioni sul rischio che un certo «evento» (morte, recidiva di malattia, altro) si manifesti ad un certo tempo dall'inizio dello studio, che solitamente viene riferito all'epoca di esecuzione della terapia (chirurgica, medica, altro).

Tali test sono stati introdotti per superare due problemi:

1. i soggetti vengono inseriti nello studio in momenti diversi;
2. l'intervallo temporale tra inserimento nel gruppo di studio e controllo è diverso; in particolare tra i soggetti vivi o liberi da malattia vi saranno alcuni controllati dopo 2 anni e altri dopo 10 anni dal momento di inserimento nello studio; lo studio attuariale consente di ottenere informazioni inserendo tutti i soggetti del campione, indipendentemente dalla durata del follow-up.

Il metodo di calcolo delle curve di sopravvivenza attuariali di più comune utilizzo è quello di Kaplan-Meier. Questo metodo prevede la creazione di un diagramma cartesiano in cui l'asse delle x riporta il tempo, generalmente in mesi, e l'asse delle y la percentuale di sopravvivenza. Il valore di riferimento per quanto attiene la sopravvivenza può essere la morte del soggetto o la recidiva di malattia («evento»); tale informazione, ovviamente, deve essere fornita nei materiali e metodi. Inoltre i

casi morti per altre malattie dovrebbero essere inseriti comunque come eventi, mentre in caso di perdita di vista del soggetto viene fatto riferimento all'epoca dell'ultimo controllo ed il soggetto viene considerato come vivo o libero da malattia.

Il dato saliente è costituito dal fatto che la percentuale di sopravvivenza ad un determinato mese non corrisponde alla percentuale di soggetti vivi, o liberi da malattia, ma alla percentuale di eventi (morte o nuova insorgenza di malattia) rispetto al numero totale di casi che hanno un follow-up pari o superiore a quello considerato, pertanto i valori ottenuti con il calcolo attuariale sono sempre inferiori rispetto alla percentuale di sopravvivenza reale.

Al fine di comprendere il calcolo matematico che è alla base del metodo di Kaplan Maier può essere utile simulare un ipotetico studio su 15 soggetti affetti da neoplasia laringea e trattati con laringectomia conservativa. Nello studio si fa riferimento alla morte dei soggetti in esame. In questa casistica fino al 4° mese non si sono verificate morti per cui la curva rimane al 100%. Al 4° mese si verificano 2 decessi per cui la percentuale di sopravvivenza scende a $13/15 = 86,7\%$. Al 39° mese si verifica un nuovo decesso per cui la curva scende a $(86,7 \times 11)/12 = 79,5\%$, e così via. In questo modo la curva è sempre in progressiva discesa. Nella nostra simulazione viene ipotizzato il decesso di altri due soggetti entro il 55 mese. In Figura 3 viene riportata la curva di sopravvivenza attuariale secondo Kaplan-Meier della simulazione dello studio sopra riferita. Nel diagramma i punti in cui si verifica una discesa della curva corrispondono ad un decesso mentre le croci fanno riferimento ai mesi di follow-up dei soggetti in vita (in questi casi non si verifica una caduta della curva).

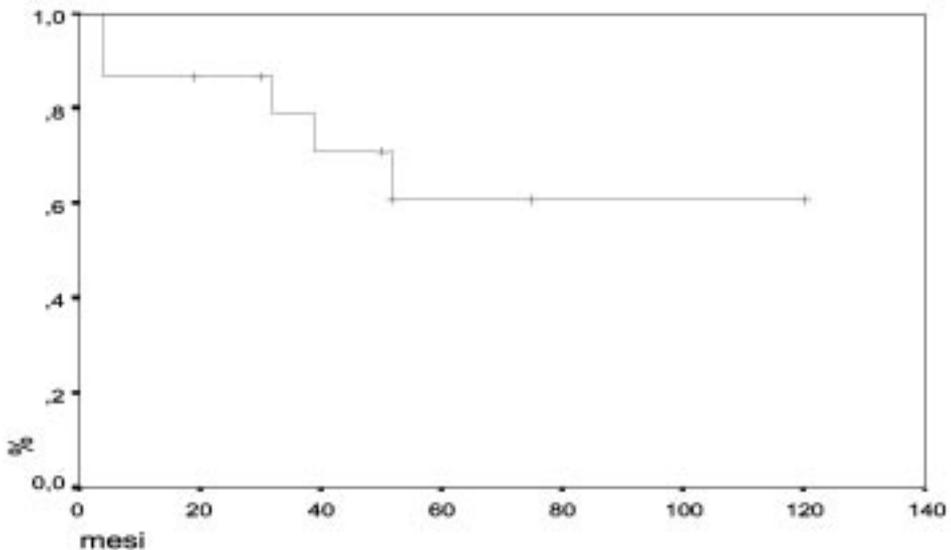


Fig. 3.
Simulazione di una curva di sopravvivenza.

Se, paradossalmente, il caso che ha il più lungo follow-up è un caso-evento (morte o recidiva di malattia) la curva scende a 0%, anche se vi sono ancora molti soggetti con follow-up più breve in buona salute.

Si ribadisce che le curve attuariali di sopravvivenza definiscono un valore percentuale di «sopravvivenza» che è certamente più basso di quello dei soggetti realmente vivi, o liberi da malattia e che esprime, in termini percentuali, il rischio che ha una persona di morire o di avere una recidiva ad una certa distanza temporale dall'inizio dello studio. Infatti ritornando alla nostra simulazione di Figura 3 al termine dello studio la percentuale di sopravvivenza reale è pari al 72% (4 morti/14 casi) mentre la sopravvivenza attuariale è pari al 60% circa.

Un parametro numerico che consente di descrivere la sopravvivenza è la cosiddetta «sopravvivenza media» che corrisponde al momento, espresso in mesi, in cui la curva raggiunge il valore di 50%. Ovviamente tale parametro è valutabile solo se la curva scende sotto il valore di 50%.

Mediante il log-rank test vi è inoltre la possibilità di porre a confronto due o più curve di sopravvivenza, definendo se tale differenza sia statisticamente significativa (ad esempio per $p < 0,05$). In questo modo è possibile definire se, ad esempio, una terapia antineoplastica sia superiore ad un'altra.

Analisi multivariata: tali metodiche consentono di definire tra una serie di parametri quello, o quelli, che più influenzano l'esito di una certa patologia. Ad esempio è possibile definire in caso di tumori della laringe omogenei tra loro per TNM e per trattamento eseguito se esistano dei parametri che possono influenzare maggiormente l'esito della terapia, quali età, presenza di altre patologie, ecc.

La peculiarità di tali metodi statistici è quella di definire l'importanza di una certa variabile ipotizzando che le altre siano costanti e, quindi non influenti sull'andamento della malattia in studio.

Questi tests consentono, quindi, di superare il problema dei tests statistici cosiddetti univariati (ad esempio le curve di sopravvivenza attuariali, i tests di correlazione, il test del chi quadro, il t test di Student, ecc.) che si basano sull'analisi di un solo parametro senza consentire di definire l'importanza di altri parametri non presi in considerazione.

Esistono numerosi metodi matematici di analisi multivariata; il più semplice è la regressione parziale, applicabile nel caso in cui vi sia una correlazione di tipo lineare tra i parametri.

In ambito oncologico è certamente più utilizzato il metodo di Cox, basato sull'analisi delle curve di sopravvivenza. Al fine di avere un dato affidabile con il metodo di Cox il numero di parametri considerati non dovrebbe superare di 1/5-1/10 il numero di casi evento (soggetti deceduti o con ripresa di malattia); in altre parole se in una casistica vi sono 50 casi-evento si possono esaminare non più di 5-10 parametri.

METANALISI

La metanalisi è una metodologia statistica che consente di sintetizzare criticamente i risultati ottenuti in più studi (eseguiti da autori e su casistiche differenti), ovviamente sullo stesso argomento, e di formulare un giudizio complessivo. È dive-

nuta una tecnica statistica d'uso corrente per la verifica ed il confronto fra dati provenienti da trials clinici differenti, soprattutto su patologie non molto frequenti.

L'obiettivo principale della metanalisi è quello di poter generalizzare i risultati sulla reale efficacia di un certo trattamento mettendo insieme le risultanze di casistiche differenti, che considerate singolarmente avrebbero una attendibilità limitata, per l'esiguo numero di casi.

I momenti fondamentali per garantire una corretta applicazione della metanalisi sono la fase di selezione dei lavori presenti in letteratura sull'argomento di interesse (omogeneità del campione, applicazione di una corretta randomizzazione, ecc.) e la valutazione critica dei risultati.

L'esito della metanalisi viene espresso in termini di «p» (probabilità che i due trattamenti sortiscano effettivamente una diversa efficacia) e di riduzione percentuale del rischio (ad esempio di morte con un trattamento piuttosto che con un altro).

TEST NON PARAMETRICI

Vengono utilizzati nel caso in cui si debbano eseguire valutazioni su campioni distribuiti in modo non normale (cioè che non seguono una distribuzione gaussiana). Possono essere considerati, come equivalenti ai tests parametrici trattati nel capitolo precedente. Verranno in questa sede semplicemente elencati i più comuni test non parametrici, mentre la loro base matematica esula dagli scopi del presente lavoro. Anche in questi test il grado di significatività è espresso in termini di «p».

Test di Mann-Whitney: corrisponde al t test di Student per il confronto tra i dati ottenuti su due campioni differenti.

Test di Wilcoxon: corrisponde al t test per dati appaiati per cui l'analisi viene svolta sui dati rilevati sullo stesso soggetto, ad esempio prima e dopo una certa terapia.

Test di Kruskal-Wallis: consente di confrontare tra loro più di due campioni ed è riconducibile al test della varianza.

Test dei ranghi di Spearman: corrisponde al test di del coefficiente di correlazione del momento-prodotto di Pearson nello studio della correlazione tra due parametri.

Nella Tabella II riportiamo esempi di disegno sperimentale con il test statistico più appropriato.

METODI STATISTICI NELLO STUDIO DEI FATTORI PROGNOTICI DEI TUMORI DELLA TESTA E DEL COLLO

Nell'ambito degli studi sui fattori prognostici nei tumori della testa e del collo, la ricerca è solitamente indirizzata all'analisi dell'espressione del fattore che si vuole studiare ed alla definizione della sua correlazione, in base a criteri clinico-patologici, con la gravità e l'evoluzione della malattia.

Tale tipo di analisi si articola in tre fasi:

1. *Disegno dello studio:* gli studi possono essere di tipo retrospettivo (su casistiche di pazienti osservati in passato) o prospettico (su pazienti che vengono esa-

Tab. II.

Disegno sperimentale	Distribuzione normale dei dati	Distribuzione non normale dei dati
Due gruppi formati da individui differenti	t-test di Student	Test Mann-Whitney
Tre o più gruppi formati da individui differenti	Analisi della varianza	Test di Kruskal Wallis
Misure ripetute prima e dopo il trattamento negli stessi individui	t-test per dati appaiati	Test di Wilcoxon
Misure ripetute multiple negli stessi individui	Analisi della varianza per misure ripetute	Test di Friedman
Relazione tra due variabili	Test della correlazione del momento-prodotto di Pearson – regressione lineare	Correlazione per ranghi di Spearman

minati dopo l'inizio dello studio), su un campione di soggetti ben bilanciato (per età, numero, tipo e sede di tumore, ecc.) e di numerosità adeguata.

2. *Obiettivo dello studio*: si tratta solitamente di analizzare la differenza di espressione del fattore prognostico in un gruppo di soggetti affetti dalla neoplasia rispetto ad un gruppo di controllo o in biopsie tumorali rispetto a tessuto bioptico di controllo sano o derivato dalla mucosa adiacente il tumore o costituito da lesioni precancerose.

3. *Metodi statistici*: mediante i test di statistica inferenziale è possibile verificare se eventuali differenze di espressione del fattore prognostico sono reali o semplicemente casuali o di valutare la relazione esistente tra misure diverse effettuate sullo stesso campione, definendone il senso della relazione (positiva o negativa) con alcuni parametri clinico-patologici associati al tumore e stabilendone la forza del legame. Quest'ultima analisi è di utilità pratica in quanto consente di definire se l'espressione di un fattore, supposto prognostico, possa essere correlata o meno con la gravità e l'evoluzione della malattia.

Lo studio delle curve di sopravvivenza è di utilità pratica in quanto permette di predire quale sia la probabilità di sopravvivere senza manifestare l'evento (sopravvivenza «liberi da malattia») o con recidive (sopravvivenza globale o totale) nel campione in studio, ad una distanza temporale dalla diagnosi o dalla terapia. Se i gruppi in studio sono più di uno, mediante l'analisi della sopravvivenza è possibile confrontare la rispettiva probabilità di sopravvivenza in relazione alla presenza o meno del fattore prognostico in esame. Inoltre, grazie ai metodi di analisi multivariata è possibile definire l'importanza dei fattori che potrebbero in qualche modo agire come confondenti (ad esempio età, condizioni generali, presenza di altre patologie, fumo, ecc.).

CONCLUSIONI

Da quanto riportato nei capitoli precedenti appare evidente come i tests statistici rappresentino uno strumento irrinunciabile nello studio dei fattori prognostici in oncologia.

La statistica è ormai una scienza che va ben oltre la semplice descrizione dei dati in quanto consente, sulla base di valutazioni eseguite su campioni limitati, di formulare ipotesi applicabili su tutti i soggetti. Questo aspetto appare di fondamentale importanza nello studio dei fattori prognostici nelle malattie neoplastiche in quanto l'analisi è, per forza di cose, limitata a piccoli campioni che di per sé potrebbero dare poche informazioni sulla reale importanza dei singoli fattori.

Nell'ambito dello studio dei fattori prognostici nei tumori sono numerosi i tests statistici che possono essere utilizzati e la loro scelta è ovviamente condizionata dal protocollo di studio che si intende seguire.

Nel caso in cui il ricercatore sia interessato a definire se un determinato fattore sia più (o meno) rappresentato nella popolazione dei soggetti affetti da tumore rispetto al gruppo di controllo sarà necessario applicare il t-test di Student o l'analisi della varianza, mentre nel caso in cui lo scopo dello studio sia quello di determinare l'importanza di un certo fattore nella prognosi si utilizzeranno i test di correlazione, di sopravvivenza e l'analisi multivariata, se si prendono in considerazione contemporaneamente più fattori.

Non deve essere inoltre sottovalutata l'importanza della scelta del campione, o dei campioni, da esaminare e della sua numerosità. Ne deriva che prima della fase di attuazione di studi nei quali si intenda eseguire una valutazione statistica dei dati è necessario formulare un preciso progetto, in cui siano definiti i parametri da analizzare e le informazioni che si intende ottenere. Solo in questo modo le metodologie statistiche possono fornire informazioni applicabili su larga scala e non rappresentare semplici descrizioni di una osservazione per forza di cose limitata ad un piccolo campione.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Blalock HM. *Statistica per la ricerca sociale*. Il Mulino Ed 1984.
- ² Cavalli Sforza LL. *Analisi statistica per medici biologi*. Torino: Bollati Boringhieri 1992.
- ³ Glanz SA. *Statistica per discipline bio-mediche*. Milano: Mc Graw Hill 1988.
- ⁴ Fischer MG. *SPSS Windows e l'analisi dei dati*. Torino: Il Segnalibro Ed. 1994.
- ⁵ Matthews DE, Farewell VT. *Using and understanding medical statistics*. Basel: Karger Ed. 1996.
- ⁶ Motulsky H. *Intuitive biostatistics*. New York: Oxford University Press Ed. 1995.
- ⁷ Rocchetta G, Vanelli ML. *Metodologie statistiche in biologia*. Bologna: CLUEB 1998.
- ⁸ Rossi C, Serio G. *La metodologia statistica nelle applicazioni biomediche*. Heidelberg: Springer Verlag Ed. 1995.
- ⁹ Tampieri A. *Introduzione alla statistica medica e biometria*. Milano: Mc Graw Hill Ed. 1996.

III. I FATTORI PROGNOSTICI CLINICI E ANATOMO-PATOLOGICI

G. Cortesina, R. Albera, A. Cavalot, T. Martone, F. Palonta, G. Preti, P. Rosso

La definizione di fattore prognostico è insita nel titolo stesso, in quanto si 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 (anche strumentale) del follow-up, scandendone i tempi (più o meno ravvicinati), e a determinare l'indicazione ad integrazioni terapeutiche che vengono ad aumentare le possibilità di controllo locale in caso di tumore particolarmente aggressivo.

In un lavoro che voglia identificare, su base scientifica la più oggettiva possibile, i fattori prognostici, il problema è quello di «mettere ordine» nei dati offerti dalla Letteratura, scegliendo quelli per i quali il significato di «prognostico» è giustificato dall'uso di un metodo d'analisi adeguato e con significatività oggettiva. Non a caso uno dei capitoli della Relazione riguarda i vari metodi di analisi statistica, con un approfondimento critico delle loro reali possibilità.

C'è inoltre in Letteratura una certa «confusione semantica» con molti sinonimi che, se male usati, confondono le idee. Sarà pertanto importante mettere ordine in questo ambito.

Il problema di metodo comunque resta il problema fondamentale, come sottolinea F. Chiesa nella sua monografia ⁴⁷ del 1998: si può dire con chiarezza che si ritiene buon metodo quello che si fonda su di una analisi statistica basata sull'analisi e sul bilanciamento dei vari fattori che possono influenzare la prognosi (come l'analisi statistica multivariata sec. Cox) e che deriva dallo studio di una casistica numericamente adeguata. Chiesa nel suo lavoro parla della necessità di avere almeno 100 casi negli studi retrospettivi e almeno 50 casi in quelli prospettici, con follow-up medio di almeno 2 anni per il controllo locale e di 5 anni per la sopravvivenza; ritiene inoltre sempre necessario l'impiego dell'analisi multivariata. Noi riteniamo giusto fare nostri e confermare questi concetti (dandone ovviamente a Chiesa la paternità).

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.

Si potranno infine distinguere i fattori prognostici sicuramente significativi (per

consenso quasi universale e per la validità dei lavori su cui si basa l'identificazione) da quelli probabilmente significativi (per i quali la base oggettiva non è così sicura e non c'è riconoscimento universale). Devono essere considerati a parte i fattori sperimentali (quali sono molti dei fattori molecolari) che non sono ancora ben validati e che richiedono tecniche complesse: per questi ultimi si può proporre l'uso e lo studio in centri di secondo livello tecnologicamente avanzati (soprattutto sotto il profilo delle biotecnologie).

Riteniamo 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 COMUNI A TUTTI I CARCINOMI SQUAMOSI DELLA TESTA E DEL COLLO (HNSCC)

Esiste tutta una Letteratura, soprattutto di cultura anglosassone, che tende ad accomunare tutti i tumori dei vari distretti cervico-facciali, nel grande gruppo degli «Head and Neck Squamous Cell Carcinomas» (HNSCC) per cui riteniamo opportuno selezionare gli studi che corrispondono a quei requisiti che abbiamo identificato nella parte iniziale, definendo e inquadrando i fattori ritenuti prognostici nei gruppi classificativi riportati nell'introduzione.

FATTORI PROGNOSTICI LEGATI AL PAZIENTE

Sono ormai definibili come fattori prognostici «consolidati»:

1) Età: l'età media di questi tumori è di 63 anni (50% tra 50 e 65 anni, 25% età superiore ai 65 anni, 3% età inferiore ai 40 anni). In alcuni studi l'età non sembra influenzare la prognosi^{6 47 73 86}. In altri studi, taluni più recenti e condotti con metodi statistici più sofisticati, l'età più avanzata si è rivelata fattore prognostico negativo^{7 23 64 80 115 116 121 164 170}. Questa discrepanza di risultati si può spiegare con la più frequente presenza, nei pazienti anziani, di comorbidità (sicuramente prognostiche) e quindi pensare che la presenza o meno, nelle varie classi di età, di malattie concomitanti sia il vero fattore che condiziona la prognosi.

2) Sesso: il sesso maschile è colpito circa 4 volte di più del sesso femminile, con un rapporto di 10/1 in età giovane^{25 47 134}. Noi riteniamo che il sesso possa essere considerato un sicuro fattore di rischio, ma non un fattore prognostico, nel senso di cui sopra, a malattia instaurata e consolidata.

3) Abitudini di vita: il permanere, a malattia insorta, di abitudini voluttuarie (es. fumo e alcool) sicuramente a rischio carcinogenetico, o il mantenimento di attività lavorative a rischio (lavorazioni con catrame e idrocarburi aromatici, lavorazioni della gomma, del Cromo, Nichel e Asbesto, lavorazioni del legno per gli adenocarcinomi etmoidali etc.) sono sicuramente fattori prognostici negativi^{1 30 47 53 142 154}.

4) Stato nutrizionale: (performance status identificabile ad esempio con l'indice di Karnofsky KI): esso si correla sicuramente (con dimostrazione statistica) con deficit immunitari³³. Le deficienze immunitarie riguardano gli elementi effettori delle difese contro il tumore (T linfociti citotossici, cellule NK, cellule APC) con con-

seguenti meccanismi di «enhancement tumorale». Uno scadimento nutrizionale dovuto all'ipoalimentazione o a fenomeni cachettici di origine neoplastica, si correla pertanto con un aumento della progressione e diffusione tumorale.

5) Patologie concomitanti: recentissimi studi condotti su casistiche molto ampie e metodi statistici adeguati, hanno dimostrato che la comorbidità (riguardante soprattutto le broncopatie croniche e le epatopatie croniche) è un sicuro fattore prognostico negativo sulla sopravvivenza. In uno studio dell'«Health Care Finance Administration» (HCFA) su 9386 pazienti è stato dimostrato, con il metodo di Cox, che lo stato nutrizionale scadente e comorbidità sono fattori prognostici negativi molto significativi. A risultati analoghi ma su casistiche più ristrette erano pervenuti Cortesina et al.^{45 60 61 95 187 188}.

6) Stato socio-economico: in uno studio di Boffetta et al. del 1994²⁶ è stato dimostrato con una certa rigorosità di metodo che un livello socio-economico più elevato si correla con una miglior prognosi. Lo studio ha riguardato tumori del cavo orale e orofaringe, e dimostrato come abitudini di vita più «meditate e controllate» (quali si osservano per lo più nelle classi sociali più evolute) si correlino con un decorso del tumore più favorevole.

7) Complicanze post operatorie: la presenza di complicanze post operatorie si correla con un decorso più sfavorevole della malattia^{47 137 139}. Si può ipotizzare come il maggiore impegno del sistema immunitario a fronteggiare la complicanza flogistica, possa essere causa di una «caduta» dell'immunosorveglianza verso il tumore.

8) Trasfusioni di sangue intero (pre, intra e post operatorie): nei lavori che hanno trattato l'argomento^{12 27}, c'è una sicura significatività statistica su casistica numericamente adeguata degli effetti negativi delle trasfusioni sulla sopravvivenza. Incerta è invece l'interpretazione: si può però ipotizzare che in qualche modo ci sia un coinvolgimento, in senso soppressivo, di quei meccanismi effettori (linfociti T citotossici, cellule NK, cellule APC) che rappresentano le barriere immunitarie verso la progressione tumorale. Sarebbero utili studi per dare evidenze oggettive a questa ipotesi.

9) Anemizzazione: c'è qualche evidenza, per qualche sede^{137 172 178}, che uno stato anemico si correla con una peggior prognosi. Si può ipotizzare che l'impegno delle cellule midollari a correggere lo stato anemico, coinvolga, in senso negativo, gli elementi immunocompetenti responsabili dell'immunosorveglianza.

10) Ritardo diagnostico e terapeutico: che il ritardo diagnostico, e quindi terapeutico, sia sfavorevole alla sopravvivenza e alla guarigione del paziente, è dato quasi assiomatico: una neoplasia diagnosticata in stadio più avanzato è ovvio che ha minori probabilità di guarigione. Esistono a questo proposito dati statistici significativi per i tumori del cavo orale⁷³), naso sinusali³⁹ e della laringe⁷¹.

FATTORI PROGNOSTICI LEGATI AL TUMORE

Possiamo distinguere:

1) Stadio di T: esiste una serie numerosa di dati, statisticamente significativi, sul fatto che al crescere dello stadio di T si evidenzia un concomitante peggioramento della sopravvivenza ed un aumento del numero delle recidive. Esistono dati biblio-

grafici importanti per il cavo orale ^{8 89 98}, per i tumori naso sinusali ^{37 38 113 156 189}, per il cavo rinofaringeo ^{13 42 90 120 158 185 201 202}, per l'orofaringe ^{72 125 140 176}, per l'ipofaringe ⁵⁶, per la laringe ^{91 137 172 177 196}, per le ghiandole salivari ^{75 82 109 191 195}.

Possiamo affermare che il passare da T1 a T4 si accompagna sicuramente, in tutti gli HNSCC, ad un peggioramento della prognosi. Resta comunque da spiegare perché certi tumori T1 si accompagnano precocemente a N2, N3 con prognosi molto grave: riteniamo che solo la presenza di fenomeni molecolari molto negativi (di cui parleremo nei capitoli successivi) possa spiegare questi particolari, anche se non frequenti, riscontri clinici.

Più recentemente sono comparsi in Letteratura studi su casistiche molto numerose condotti con l'uso dell'analisi multivariata ^{9 43 55 94 117 152} che hanno dimostrato, con grande significatività statistica che la crescita di T si correla con peggior sopravvivenza.

2) Stadio di N: è concetto ormai storico e consolidato che la presenza di metastasi linfonodali (N1-N3 clinico con pN+ anatomopatologico) si correla con una prognosi sfavorevole e quindi rappresenta un fattore prognostico negativo: è questo il segno del crollo delle prime difese immunitarie e del superamento dei limiti anatomici dell'organo colpito da neoplasia. Nella parte biologica descriveremo i meccanismi molecolari della metastatizzazione: qui ci limiteremo a valutarne la portata clinica (in senso prognostico).

Già lavori di circa 20 anni fa ^{181 182 211} avevano dimostrato, con metodi statistici ancora da migliorare, che la presenza di metastasi linfonodali e il numero di linfonodi colpiti influenzavano la prognosi negativamente (in particolare più di 3 linfonodi metastatici al pTNM erano segno di prognosi peggiore), e che il superamento istologico della capsula linfonodale da parte del tumore (Rottura Capsulare) era segno particolare di prognosi infausta ^{24 107 145 163 173 186 207}.

La verità di questi dati è stata successivamente confermata da altre ricerche ^{5 17 20 26 35 48 49 61 74 82 88 91 93 98 106 111 112 115 126 129 130 137 152 156 166 167 172 175 184 185 194 200 202 204 206}. In uno studio molto accurato su HNSCC è stato osservato che la presenza di metastasi al 5° livello cervicale è fattore prognostico decisamente negativo ⁴⁹.

Deriva da queste evidenze la grande importanza che viene ad assumere lo stadio anatomo- e istopatologico dei pezzi operatori (tumore, margini, linfonodi dello svuotamento) da cui dipende l'accuratezza del pTNM, che a sua volta sarà fondamentale nella scelta della strategia terapeutica. L'affiancamento di un buon patologo, con competenze specifiche per l'oncologia cervico-cefalica, al chirurgo, che lo affianchi nei momenti conclusivi dell'exeresi, o che, per lo meno ne regoli rapidamente la condotta, nell'orientamento dei pezzi (sia per quanto riguarda il T che l'N), nelle modalità di prelievo del tessuto sano da studiare (margini) e nell'uso dei fissativi, è condizione ormai necessaria, per aumentare le sicurezze quando basiamo su di un reperto istopatologico le scelte terapeutiche.

3) Caratteristiche istologiche del T: lo studio istologico, con le colorazioni classiche del tumore, può fornirci alcune evidenze utilizzabili per la prognosi.

a) Grading. L'influenza del Grading (le cui caratteristiche, secondo la classificazione OMS sono riportate in Tabella I sulla prognosi dei tumori, è stata oggetto di numerosi studi con risultati non sempre univoci e spesso contrastanti. Bisogna innanzitutto premettere che già nella definizione degli elementi istologici da prendere in considerazione per definirne il grading non c'è uniformità di vedute. Accanto

all'OMS che prende in considerazione grado di cheratinizzazione, numero di perle cornee, attività mitotica, presenza di giunzioni intercellulari, rapporto nucleo-plasmatico e la presenza di cellule anaplastiche, per definire 4 gradi di Grading^{57 58 69 145}, (elaborando una sorta di grading citologico), esistono anche un grading nucleare, che prende in esame soltanto aspetti del nucleo, e un grading istologico proposto da Carlon e Serafini, che prende in considerazione aspetti strutturali (e non cellulari) per definirne il grado di differenziazione^{40 41 51 57 58 144 210}. La scarsa differenziazione è stata verificata come fattore prognostico negativo in tumori naso-sinusalì^{11 17 52 78 100 143 206} e in 148 pazienti con HNSCC¹⁰⁴, mentre è risultata dubbia (con dati contrastanti) nei tumori del cavo rinofaringeo^{90 200-202}, dell'orofaringe^{4 81 167}, della laringe¹³⁷, del cavo orale¹³¹; nessun significato prognostico è stato rilevato invece in studi riguardanti l'ipofaringe⁵⁶.

b) Altre caratteristiche istologiche. È dato ormai consolidato che gli aspetti istologici verrucosi (carcinoma verrucoso) e pseudosarcomatosi si correlano con una prognosi discreta, e quindi possono giustificare trattamenti chirurgici decisamente conservativi (es. con l'uso del laser). Il carcinoma con aspetti prevalenti basaloidi ha invece prognosi decisamente peggiore¹³¹.

Il pattern d'invasione, che esprime il grado d'infiltrazione del tumore in profondità, è stato studiato come fattore prognostico decisamente negativo, nel senso che una maggiore infiltrazione si accompagna, in modo significativo, ad un numero maggiore di metastasi linfonodali. È stato osservato nel cavo orale¹³¹ che un grado d'infiltrazione inferiore a 4 mm si correla con un 8% di metastasi linfonodali, un'infiltrazione tra 4 e 8 mm si correla con un 35% di metastasi e un'infiltrazione maggiore di 8 mm si correla con un 83% di metastasi.

Risultati del tutto analoghi sono stati ottenuti in uno studio sugli HNSCC^{31 165} e nell'orofaringe^{4 77}.

Il grado d'invasione, identificato come fattore predittivo per metastatizzazione, è un dato moderno (studiato con metodo corretto) e dovrà necessariamente entrare a far parte del bagaglio culturale del patologo propedeutico, alle sue diagnosi istologiche.

Altre caratteristiche istologiche per cui esistono evidenze di un sicuro significato prognostico sono:

a) Embolizzazione intravasale da parte di cellule tumorali (E+) della quale è stato dimostrato in analisi multivariata e su casistiche numerose di HNSCC il cattivo significato prognostico^{61 104 137 208}.

b) Invasione perineurale, che è rappresentata dall'invasione da parte del tumore della guaina del perinervio, che normalmente è barriera insuperabile per le cellule tumorali. Il suo superamento è segno di grande aggressività del tumore e di un rischio significativamente aumentato di metastatizzazione linfonodale^{3 23 61 62 137 145 150}.

c) Presenza di cellule immunocompetenti: è ormai assodato che l'organismo reagisce contro l'insorgenza e la progressione di ogni tumore (e quindi anche degli HNSCC) con l'immunosorveglianza cui sovrintendono cellule immunocompetenti effettrici (APC, linfociti T citotossici, cellule NK, ADCC) e meccanismi effettori umorali (anticorpi citotossici)^{21 68-70 92 118 119 148 162 181 182}. È stato dimostrato anche, negli stessi lavori, che le potenzialità citotossiche degli elementi immunocompetenti vengono, man mano che il tumore cresce, inibite da meccanismi soppressori (citochine ad azione soppressiva, macrofagi, anticorpi bloccanti, immunocomplessi).

Difficile è stato, nelle numerosissime ricerche ad hoc, reperire tests immunitari che fossero predittivi del decorso clinico, per la grande variabilità dei meccanismi coinvolti (di segno talora opposto) e per il loro mutare continuo nel tempo.

Esistono però dati personali ricavati da studi eseguiti su casistica adeguata con l'uso dell'analisi multivariata^{61 62 137} che dimostrano che la presenza di un infiltrato cospicuo T linfocitario tra le maglie del tumore (TIL) si accompagna a miglior prognosi, mentre la presenza di un infiltrato plasmocitario si correla con prognosi peggiore. Questo dato è spiegabile con il fatto che le plasmacellule sintetizzerebbero anticorpi bloccanti l'azione citotossica dei T linfociti.

Doveroso inoltre citare le ricerche di Gallo⁷⁹ e di Ottaviani et al.^{197 198} che hanno riconosciuto un certo valore prognostico all'infiltrato intratumorale di cellule dendritiche e cellule di Langherans: tali elementi vanno però inquadrati tra i fattori prognostici sperimentali, trattandosi di casistiche non numerose e non essendo stata impiegata l'analisi multivariata.

4) Sede del tumore. L'unico studio in Letteratura che valuta, in analisi multivariata, la sede con peggior significato prognostico, è uno studio personale^{61 137} in cui abbiamo dimostrato, in una casistica di 398 HNSCC di tutte le sedi classiche del distretto «testa-collo» che quella ipofaringea è significativamente a prognosi peggiore.

5) Tempo di recidiva. In un recente studio, su 446 pazienti con HNSCC, eseguito in analisi multivariata, è stato attribuito, con grande significatività statistica, un significato prognostico negativo nei confronti della sopravvivenza al tempo di recidiva⁹⁶: tempi di recidiva brevi sono correlati con una peggior sopravvivenza^{128 149 190}.

FATTORI PROGNOSTICI LEGATI ALLA TERAPIA

Fattori prognostici legati alla chirurgia

Una chirurgia scorretta o inadeguata che causa un controllo locale imperfetto e conseguente presenza di margini positivi per tumore, è fattore prognostico tra i più negativi^{7 19 29 46 61 133 135-139 196}.

In un lavoro molto interessante¹⁹² si è cercato di fare una classificazione dei gradi di positività dei margini:

a) grado 1 e 2 costituiti da forma vegetante del tumore residuo adiacente al tumore asportato; b) grado 3 e 4 costituiti da forma infiltrante: i gradi 3 e 4 si correlano in modo statisticamente significativo con le possibilità di recidiva loco-regionale. Una recente Tavola Rotonda al Congresso SIO, 1997 ha approfondito il problema dei margini dopo exeresi chirurgica¹⁷⁴. Si è cercato in quella sede di definire e razionalizzare i criteri di radicalità chirurgica (che sono ovviamente correlati strettamente con il problema dei margini di resezione). Sono stati identificati alcuni punti chiave.

1) L'importanza dell'orientamento del pezzo chirurgico, che richiede una stretta collaborazione tra patologo e chirurgo, con definizione precisa di criteri standard che devono sempre essere seguiti.

2) Il problema della retrazione dei tessuti post fissazione (che può variare dal 15% al 40%), che porta alla sottostima della distanza del tumore dai margini e del-

la dimensione della neoplasia: si può dire che una distanza tra tumore e margini di 5 mm valutata su preparato istologico fissato corrisponde in vivo a 8-9 mm.

3) Il problema delle modalità di prelievo, che devono essere definite da patologo e chirurgo, individuando anche un numero standard di prelievi.

4) La definizione del concetto di «close margin», per indicare un margine che, pur essendo negativo, è molto vicino al tumore (anche se è difficile standardizzare una distanza minima della neoplasia dai margini, in modo da garantire un basso numero di recidive). Loree e Strong (1990)¹³² hanno osservato ugual numero di recidive quando i margini distano dal tumore meno di 0,5 mm e quando sui margini compare displasia media o grave. Yuen et al.²⁰⁹ (1998) identificano nel cavo orale una distanza di sicurezza minima pari a 2 cm.

5) L'importanza del «tipo di positività del margine»: presenza di «avanzamento frontale» del tumore, o di «infiltrazione»; quest'ultimo si accompagna ad un maggior numero di recidive.

6) L'importanza di un uso sistematico di diagnosi al congelatore in estemporanea, che hanno dimostrato una concordanza con la diagnosi istologica tradizionale pari al 96%-98%.

7) Pur non essendoci studi mirati alla risoluzione del problema, possiamo qui proporre come «margine sicuro» (con i metodi istologici tradizionali) quello che appare negativo a 1,5-2 cm dal tumore nel cavo orale e nell'orofaringe, a 3-5 mm in laringe e ad 1 cm circa in ipofaringe. Troppo complessa e articolata è invece l'architettura anatomica del sistema naso-sinusale per poter permettere una standardizzazione delle «misure sicure» dei margini in questa sede.

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 Radio-chemioterapia, 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 e un'inadeguatezza di tecnica o di dose, porta ad un difettoso controllo locale e diventa pertanto un fattore prognostico negativo (che può però essere recuperato in alcuni casi, con un «rattrapage» chirurgico)¹⁵⁹.

Ritardo terapeutico

Si possono a questo punto ripetere le stesse considerazioni fatte a proposito del ritardo diagnostico (vedere pagine precedenti) cui rinviamo.

I fattori prognostici fino ad ora descritti valgono per tutti gli HNSCC, e quindi per tutte le sedi del distretto cervico-cefalico, anche se per alcune sedi il «background» sperimentale è più forte. Trattasi in ogni caso di fattori prognostici sicuramente significativi.

Esistono però altri fattori che sono più specifici per alcune sedi, in quanto più legati alla strutturazione anatomica e ad una storia naturale particolare di certe regioni.

Li andremo qui ad esaminare sede per sede.

CAVO ORALE

Un problema specifico del cavo orale è rappresentato dall'invasione ossea: secondo alcuni Autori ^{65 122} l'interessamento della mandibola è causa di un peggioramento prognostico significativo nei confronti della sopravvivenza. Altri recenti dati, emersi nella Consensus Conference sui Tumori del Cavo Orale, Udine 2002 ¹⁶¹, indicano che l'invasione mandibolare da parte del tumore rende necessaria una chirurgia più demolitiva con l'impiego di lembi ricostruttivi, e che tale chirurgia, se indicata ed eseguita in modo corretto, non cambia le possibilità di successo sul controllo locale e sulla sopravvivenza.

In ricerche personali ¹³⁹ abbiamo dimostrato, in analisi multivariata che la sottosedo bordo lingua (1/3 medio) si correla con miglior prognosi, mentre i tumori del pavimento laterale (metà posteriore) si correlano con peggior prognosi.

In questa sede inoltre appare assai più grave il problema dei margini di resezione, in quanto nel cavo orale si calcola un aumento significativo, rispetto ad altre sedi, della probabilità di avere margini di resezione positivi, cui si accompagna un aumento del tasso di recidiva e un peggioramento della sopravvivenza ^{7 34 97 133 192}.

Particolare importanza ha nel cavo orale la profondità d'invasione (così come nell'orofaringe) come risulta da alcuni studi molto ben condotti ^{4 77 108}: un'invasione profonda si correla sempre con una prognosi peggiore.

Acquistano nel cavo orale importanza prognostica altre sottosedo: i tumori del palato molle, del pavimento posteriore, i tumori ad evoluzione orofaringea hanno una prognosi decisamente peggiore rispetto ai tumori di altre sottosedo (studio di Liù et al. in analisi multivariata su 2.500 pazienti) ¹²⁶.

OROFARINGE

Riguardano l'orofaringe i dati più sicuri riguardanti il deficit immunitario che si accompagna alla nascita e alla crescita del tumore. In uno studio di 110 pazienti portatori di carcinoma dell'orofaringe, è stato osservato ¹⁸⁰ un'attività delle cellule Natural Killer (NK) significativamente ridotta ($p < 0,0001$) rispetto all'attività NK di 137 pazienti sani. Tale riduzione di attività NK è correlata significativamente ($p < 0,01$) con un peggioramento della sopravvivenza.

Esistono 4 studi ^{14-16 26} in cui si è osservato che le forme vegetanti e superficiali hanno avuto un decorso migliore rispetto alle forme infiltrative.

Interessanti sono anche gli studi riguardanti il valore prognostico di talune sottosedo. Pradier et al. (1996) ¹⁶⁷ hanno dimostrato che i tumori della parete laterale dell'orofaringe hanno una prognosi migliore ($p < 0,05$), dati questi confermati da Marandas et al. (1995) e da Wang et al. (1995) ^{141 205}.

In uno studio di Lefebvre (1994) ¹²⁷ si è osservata una prognosi peggiore per i tumori del solco amigdaloglosso, e una prognosi migliore per l'area di giunzione dei pilastri ($p < 0,0001$). Così pure il coinvolgimento della base lingua si è rivelato un fattore prognostico negativo ⁸⁷. Occorre infine citare lo studio di Spriano et al. (1994) ¹⁹⁴ su 351 pazienti in analisi multivariata, in cui si è dimostrato un andamento peggiore dei tumori ad evoluzione craniale, rispetto a quelli ad evoluzione caudale (ai limiti della significatività statistica).

Nell'orofaringe acquistano particolare significato gli studi riguardanti la profondità d'invasione ed il suo significato prognostico, di cui si è già parlato nelle pagine precedenti.

Tra i fattori riguardanti la terapia citiamo due lavori specifici dell'orofaringe¹²³¹⁶⁷ in cui non è stata osservata differenza significativa nella sopravvivenza tra il trattamento radioterapico e quello chirurgico; la chemioterapia neo-adiuvante non ha migliorato la sopravvivenza. Al contrario in ricerche personali¹³⁹ abbiamo osservato una minor incidenza di recidive dopo chirurgia vs. RT e RT-CT ($p < 0,05$). Sempre in ricerche personali⁵⁹⁶² condotte in analisi multivariata su 220 pazienti, abbiamo osservato che il trattamento loco-regionale con Interleukina-2 (IL2) a basse dosi, ha diminuito in modo significativo ($p < 0,01$) il numero di recidive.

In studi Radioterapici¹⁶³²⁷²⁹⁹¹⁰¹¹⁰⁵¹²⁵¹³⁹¹⁴⁷¹⁶⁹²⁰⁵ è stato osservato che lo stadio III, IV si correla ad una minor risposta alla RT, che il bi-frazionamento è migliore del mono-frazionamento, che il tempo breve di risposta alla RT è favorevole per la prognosi, che i tumori tonsillari ad evoluzione anteriore, hanno un controllo locale peggiore dopo RT, che l'aumento della dose non influenza la sopravvivenza, che è invece influenzata positivamente se la durata del trattamento è ridotta.

Da studi Chemioterapici e Radio-chemioterapici¹⁰²⁸⁵⁴⁶³⁷⁶¹⁰³¹¹⁰¹²³¹²⁴¹⁵⁷¹⁶⁰¹⁶⁸¹⁹⁹ emerge che la risposta completa (RC) è predittiva, in modo decisamente significativo, per la sensibilità alla radioterapia e si correla con una miglior sopravvivenza. Questi risultati sono fondamentali per giustificare di proporre a pazienti candidati a chirurgia con alto rischio funzionale l'alternativa di CT seguita da RT, con possibilità di successiva eventuale Chirurgia di recupero.

DISTRETTO NASO-SINUSALE

Esistono alcune evidenze specifiche, in materia di fattori prognostici, che riguardano i tumori naso-sinusalì. Molto importante è il discorso di alcune sottosedi coinvolte: le neoplasie della parete antero-inferiore del seno mascellare (la vecchia infrastruttura) si propagano solo tardivamente verso le «strutture nobili» soprastanti e quindi hanno prognosi più favorevole, esattamente il contrario invece avviene per i tumori dell'etmoide e dello sfenoide.

Lo stadio di T e lo stadio di N, che sono fattori prognostici universali per gli HNSCC, qui assumono un significato decisamente più importante. Uno stadio IV (che si accompagna ad invasione endocranica) e un N+ (che normalmente è raro in questi tumori) si accompagnano quasi sempre ad una prognosi decisamente infau-
sta, in modo più rilevante rispetto a quanto avviene in altre sedi.

Ci sono alcuni dati, peculiari della sede, che riguardano il significato prognostico di alcuni aspetti istologici (che qui sono molto più multiformi rispetto agli altri distretti cervico-facciali). Il carcinoma indifferenziato, specie se etmoidale¹⁷, ha prognosi pessima, mentre il carcinoma adenoidecistico ha sopravvivenza più lunga (talora a 10 anni) per cui in questi casi l'essere liberi da malattia a 5 anni non ha significato di guarigione avvenuta⁵²¹⁰⁰¹⁴³¹⁵³¹⁸³. Particolarmente importante in questa sede è il ritardo diagnostico e terapeutico, già descritto per gli altri HNSCC. Essendo i tumori iniziali spesso asintomatici o contraddistinti da sintomi nasali aspecifi-

ci, molto spesso la prima diagnosi avviene in stadio avanzato, con quelle conseguenze gravi per la prognosi, di cui abbiamo già parlato.

Così pure particolarmente importante è il problema dei margini chirurgici, vista la grande complessità anatomica della regione, che rende più difficile la valutazione visiva dell'exeresi chirurgica e anche il lavoro del patologo sui margini sani.

RINOFARINGE

Un fattore molto importante di questa sede è il rischio, al momento della diagnosi, di uno stadio avanzato di T e della presenza di un N diverso da 0; così pure il riscontro alla diagnosi di metastasi a distanza. Questo fatto è molto frequente in quanto la diagnosi di un tumore rinofaringeo iniziale è molto difficile, in quanto i sintomi delle forme iniziali sono aspecifici e molto spesso misconosciuti ^{90 114 120 158 185 200-202}.

Acquistano inoltre significato prognostico negativo al momento della diagnosi l'erosione ossea della base cranica (all'imaging), le paralisi dei nervi cranici, l'estensione pararinofaringea ^{50 179 200-202}.

Molto incerta e discussa è l'importanza prognostica del grading, che viene riconosciuta come tale soltanto dagli AA di Hong Kong ^{200 202}.

Il livello cervicale basso di N è stato riconosciuto a prognosi sfavorevole per la diffusione metastatica ^{85 114 146 200-202}.

Esistono infine 3 studi randomizzati fatti per verificare la reale utilità dell'aggiunta della CT alla RT nei confronti della RT sola. Lo studio di Chan ⁴⁴ non mostra alcun vantaggio dell'aggiunta di CT a RT (CDDP + 5FU) mentre gli studi di Al-Sarraf ² e dell'International Nasopharynx Study Group ¹⁰² mostrano un vantaggio dell'aggiunta rispettivamente di CDDP + 5FU e di bleomicina, epirubicina e CDDP alla RT.

Sembrirebbe pertanto esserci un trend prognostico favorevole integrando la RT con la CT ⁸⁴.

IPOFARINGE

Valgono per l'ipofaringe tutti i fattori prognostici di vario tipo identificati per gli HNSCC in generale, senza che alcuno di essi acquisti peculiarità di significato.

Si può enfatizzare per questa sede il significato prognostico della risposta completa (RC) alla CT come indice di buona sensibilità alla RT (e quindi come fattore prognostico favorevole) e quindi utilizzare questo dato per l'indicazione di protocolli di preservazione d'organo ²².

LARINGE

Lo stesso discorso fatto per l'ipofaringe vale per la laringe, per la quale valgono tutti i fattori prognostici descritti per gli HNSCC. Come pure si può ripetere qui il discorso dell'utilizzo della RT insieme alla CT per l'indicazione di protocolli di

Tab. I.

Grading istopatologico (TNM V ed.-1997 U.I.C.C.).

Gx	Il grado di differenziazione non può essere accertato
G1	Ben differenziato
G2	Moderatamente differenziato
G3	Scarsamente differenziato
G4	Indifferenziato

preservazione d'organo, cui oggi è riconosciuta da più parti una certa validità.

GHIANDOLE SALIVARI

Come già ripetuto per tutte le altre sedi del distretto cervico-facciale, valgono per le ghiandole salivari gli stessi fattori prognostici descritti per gli HNSCC in generale.

Una particolare significatività, nei vari studi, hanno lo stadio di T^{75 82 83 109 171 191 193} e quello di N^{5 75 82 111}.

Ci sono inoltre evidenze significative a favore di una peggior prognosi legata alla sede: in passato si è attribuita una maggior aggressività ai tumori insorti nelle ghiandole sottomascellari. I lavori più recenti, con l'uso dell'analisi multivariata, non confermano l'importanza della sede come valore indipendente significativo^{5 151 171} anche se si può riconoscere un certo trend negativo.

Incerte sono anche le opinioni su tumori insorti nel lobo profondo della parotide²⁰³. La paralisi del facciale presente al momento della diagnosi è sicuramente un fattore prognostico negativo^{75 82 83 191}. In uno studio su 1.029 casi⁶⁷ è stata osservata paralisi del nervo VII nel 14% dei casi: in questi casi si è avuto il 77% di comparsa di metastasi linfonodali, con sopravvivenza 0%. Anche l'infiltrazione istologica del nervo è risultata essere predittiva di metastasi occulte⁷⁵. Ci sono anche in Letteratura due studi^{75 82} in cui, in analisi multivariata, si dimostra un trend per un significato prognostico negativo da attribuire all'estrinsecazione extracapsulare, all'invasione perilinfatica e a quella perineurale.

Alcune considerazioni particolari vanno fatte per quanto riguarda l'istotipo e il grading. Esistono nelle ghiandole salivari istotipi con comportamento di aggressività costante (carcinoma squamoso) e istotipi a comportamento variabile (adenocarcinoma, carcinoma adenoide-cistico, carcinoma a cellule aciniche, carcinoma muco-epidermoidale)^{18 66 75 109 151 171 203}.

Per queste forme è stata riconosciuta una classificazione che distingue tumori a basso, medio, alto grado di malignità (Tab. II).

Si possono pertanto distinguere, con una certa sicurezza, nell'ambito delle ghiandole salivari due gruppi di tumori maligni: 1) carcinomi squamosi, per i quali valgono i concetti del significato prognostico del grading (anche qui controverso); 2) adenocarcinomi, carcinomi adenoide-cistici, tumori a cellule aciniche, tumori muco-epidermoidali, per i quali vengono universalmente riconosciuti 3 gradi di malignità (basso, medio, alto) che possono condizionare le indicazioni terapeutiche.

Tab. II.

Classificazione delle neoformazioni maligne delle ghiandole salivari in accordo al comportamento biologico.

-
1. A BASSO GRADO
 - carcinoma mucoepidermoide
 - carcinoma a cellule aciniche
 - adenocarcinoma polimorfo a basso grado
 - adenocarcinoma a cellule basali

 2. A GRADO INTERMEDIO
 - carcinoma mucoepidermoide
 - carcinoma epimioepiteliale
 - adenocarcinoma sebaceo

 3. ALTO GRADO
 - carcinoma mucoepidermoide
 - carcinoma adenoide-cistico
 - tumore misto maligno
 - carcinoma dei dotti salivari
 - carcinoma a cellule squamose
 - adenocarcinoma oncocitico
-

È stata infine proposta per le ghiandole salivari l'istituzione delle classi prognostiche (a basso, medio e ad alto rischio) in cui vengono conglobati, ai fini del giudizio prognostico, istotipo e grading, stadio e grading, stadio e istotipo ^{36 171 203}.

Per la classe a basso rischio sarebbe indicata la sola chirurgia conservativa e per la classe a medio rischio, chirurgia estesa + svuotamento cervicale + RT.

Lo svuotamento cervicale è sempre indicato in casi N+ ^{74 109 155 203} in quanto è dimostrato che migliora la sopravvivenza, mentre ne è controversa l'indicazione in casi N0 ^{36 155}. Si tende però a indicare lo svuotamento nei casi N0, quando la classe prognostica sia ad alto rischio.

CONCLUSIONI

Riteniamo che i fattori prognostici descritti nelle pagine precedenti abbiano una validazione oggettiva (in base ai criteri di metodo esposti nella parte introduttiva) più che sufficiente e che quindi possano essere ufficialmente proposti a coloro (otorinolaringoiatri, chirurghi oncologi del distretto testa-collo, chirurghi maxillo-facciali, radioterapisti, oncologi medici) che si occupano di questi tumori. Sarebbe auspicabile che nelle moderne cartelle computerizzate comparisse uno spazio riservato ai fattori prognostici clinici e anatomico-patologici, che riassumiamo nella Tabella III.

Tab. III.

Modello di cartella clinica computerizzata.

FATTORI PROGNOSTICI CLINICI E ANATOMO-PATOLOGICI

FATTORI LEGATI AL PAZIENTE

- 1. Abitudini di vita e attività lavorativa.....
-
-
- 2. Performance status (indice di Karnofsky)
- 3. Patologie concomitanti
-
-
- 4. Stato socio-economico
-
- 5. Complicanze post-operatorie
-
-
- 6. Trasfusioni
- 7. Anemizzazione
- 8. Ritardo diagnostico

FATTORI LEGATI AL TUMORE

- 1. Stadio di T
- 1a. Pattern d'invasione
-
- 1b. Grading
- 1c. Istotipo
-
- 1d. Embolizzazione intravasale (E+)
- 1e. Invasione perineurale
- 1f. Cellule immunocompetenti
-
- 1g. Sede di T
- 1h. Invasioni osteo-cartilaginee
-
- 1i. Paralisi nervose
-
-
- 2. Stadio di N
- 2a. N° linfonodi metastatici
- 2b. Livello linfonodale con
- linfonodi metastatici
- 2c. rottura capsulare (R+)

FATTORI LEGATI ALLA TERAPIA

- 1. Chirurgia
 - 1a. Margini
 -
 - 2. Radioterapia e radiochemioterapia
 - 2a. Mancata risposta
 - 2b. Risposta incompleta
 - 3. Ritardo terapeutico
-

BIBLIOGRAFIA

- 1 Agudelo D, Quer M, Leon X, Diez S, Burgues J. *Laryngeal carcinoma in patients without a history of tobacco and alcohol use*. *Head Neck* 1997;19:200-4.
- 2 Al-Sarraf M, LeBlanc M, Giri PG, Fu KK, Cooper J, Vuong T, et al. *Chemoradiotherapy versus radiotherapy in patients with advanced nasopharyngeal cancer: phase III randomized intergroup study 0099*. *J Clin Oncol* 1998;16:1310-7.
- 3 Alvi A, Johnson JT. *Development of distant metastasis after treatment of advanced-stage head and neck cancer*. *Head Neck* 1997;19:500-5.
- 4 Ambrosch P, Kron M, Fischer G, Brinck U. *Micrometastases in carcinoma of the upper aerodigestive tract: detection, risk of metastasizing, and prognostic value of depth of invasion*. *Head Neck* 1995;17:473-9.
- 5 Anderson JN Jr, Beenken SW, Crowe R, Soong SJ, Peters G, Maddox WA, et al. *Prognostic factors in minor salivary gland cancer*. *Head Neck* 1995;17:480-6.
- 6 Antoniadis DZ, Styanidis K, Papanayotou P, Trigonidis G. *Squamous cell carcinoma of the lips in a northern greek population. Evaluation of prognostic factors on 5 years survival rate*. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995;3:333-9.
- 7 Ash CS, Nason RW, Abdoh AA, Cohen MA. *Prognostic implications of mandibular invasion in oral cancer*. *Head Neck* 2000;22:794-8.
- 8 Atula S, Kurvinen K, Grenman R, Syrjanen S. *SSCP pattern indicative for p53 mutation in related to advanced stage and high-grade of tongue cancer*. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996;32:222-9.
- 9 Baatenburg de Jong RJ, Hermans J, Molenaar J, Briaire JJ, le Cessie S. *Prediction of survival in patients with head and neck cancer*. *Head Neck* 2001;23:718-24.
- 10 Bachaud JM, David JM, Shubinski RE, Perineau D, Boussin G, Serrano E, et al. *Predictive factors of a complete response to and adverse effects of a CDDP-5FU combination as primary therapy for head and neck squamous carcinomas*. *J Laryngol Otol* 1993;107:924-30.
- 11 Badib AO, Kurohara SS, Webster JH, Sheed DP. *Treatment of cancer of the paranasal sinuses*. *Cancer* 1969;23:533-7.
- 12 Barra S, Barzan L, Maione A, Cadelano A, Pin M, Franceschi S. *Blood transfusion and other prognostic variables in the survival of patients with cancer of the head and neck*. *Laryngoscope* 1994;104(1 Pt 1):95-8.
- 13 Barzan L, Politi D, Grando G, Savignano MG. *Neoplasie del rinofaringe*. In: Chiesa F., Squadrelli Saraceno M, eds. *Fattori prognostici in oncologia cervico-facciale*. Pisa: Pacini Ed. 1998:27-35.
- 14 Bataini JP, Asselain B, Jaulerry C, Brunin F, Bernier J, Pontvert D. *A multivariate primary tumor control analysis in 465 patients treated by radical radiotherapy for cancer of the tonsillar region: clinical and treatment parameters as prognostic factors*. *Radiother Oncol* 1989;14:265-77.
- 15 Bataini JP, Bernier J, Asselain B, Lave C, Jaulerry C, Brunin F. *Primary radiotherapy of squamous cell carcinoma of the oropharynx and pharyngolarynx: tentative multivariate modelling system to predict the radiocurability of neck nodes*. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 1988;14:635-42.
- 16 Bataini JP, Jaulerry C, Brunin F, Ponvert D, Ghossein NA. *Significance and therapeutic implications of tumor regression following radiotherapy in patients treated for squamous cell carcinoma of the oropharynx and pharyngolarynx*. *Head neck* 1990;12:41-9.
- 17 Batsakis JG, Rice DH, Solomon AR. *The pathology of head and neck tumors: squamous and mucous-gland carcinomas of the nasal cavity, paranasal sinuses, and larynx, part 6*. *Head Neck Surg* 1980;2:497-508.
- 18 Batsakis JG. *Staging of salivary gland neoplasms: role of histopathologic and molecular factors*. *Am J Surg* 1994;168:386-90.
- 19 Batsakis JG. *Surgical margins in squamous cell carcinomas*. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1988;97:213-4.
- 20 Batsakis JG. *Tumors of the head and neck. Clinical and pathological considerations*. Baltimore: 2nd Ed. Williams & Wilkins 1979:177-87.
- 21 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.
- 22 Beauvillain C, Mahe M, Bourdin S, Peuvrel P, Bergerot P, Riviere A. *Final results of a randomi-*

- zed trial comparing chemotherapy plus radiotherapy with chemotherapy plus surgery plus radiotherapy in locally advanced resectable hypopharyngeal carcinomas. *Laryngoscope* 1997;107:648-53.
- 23 Beenken SW, Krontiras H, Maddox WA, Peters GE, Soong S, Urist MM. *T1 and T2 squamous cell carcinoma of the oral tongue: prognostic factors and the role of elective lymph node dissection*. *Head Neck* 1999;21:124-30.
- 24 Bennet SH. *Prognostic significance of histologic host response in cancer of the larynx or hypopharynx*. *Cancer* 1971;28:1255-6.
- 25 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.
- 26 Boffetta P, Merletti F, Magnani C, Terracini B. *A population based-study of prognostic factors in oral and oropharyngeal cancer*. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1994;30:369-73.
- 27 Bongioannini G, Vercellino M, Rugiu MG, Ferreri A, Succo G, Cortesina G. *Influence of perioperative transfusion therapy on the recurrence potential of locally advanced laryngeal carcinoma*. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1990;52:260-4.
- 28 Bourhis J, Wilson G, Wibault P, Janot F, Bosq J, Armand JP, et al. *Rapid tumor cell proliferation after induction chemotherapy in oropharyngeal cancer*. *Laryngoscope* 1994;104:468-72.
- 29 Bradford CR, Wolf GT, Fisher SG, McClatchey KD. *Prognostic importance of surgical margins in advanced laryngeal squamous carcinoma*. *Head Neck* 1996;18:11-6.
- 30 Browman GP, Wong G, Hodson I, Sathya J, Russell R, McAlpine L, et al. *Influence of cigarette smoking on the efficacy of radiation therapy in head and neck cancer*. *New Engl J Med* 1993;328:159-63.
- 31 Bryne M, Boysen M, Alfsen CG, Abeler VM, Sudbo J, Nesland JM, et al. *The invasive front of carcinomas. The most important area for tumour prognosis?* *Anticancer Res* 1998;18(6B):4757-64. Review.
- 32 Bundgaard T, Bentzen SM, Wildt J, Sorensen FB, Sogaard H, Nielsen JE. *Histopatologic, stereologic, epidemiologic and clinical parameters in the prognostic evaluation of squamous cell carcinoma of the oral cavity*. *Head Neck* 1996;16:142-52.
- 33 Bundgaard T, Bentzen SM, Wildt J. *The prognostic effect of tobacco and alcohol consumption in oral squamous cell carcinoma*. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1994;30:323-8.
- 34 Byers RM, Bland KI, Borlase B, Luna M. *The prognostic and therapeutic value of frozen section determinations in the surgical treatment of squamous carcinoma of the head and neck*. *Am J Surg* 1978;136:525-8.
- 35 Byers RM, El-Naggar AK, Lee YY, Rao B, Fornage B, Terry NH, et al. *Can we detect or predict the presence of occult nodal metastases in patients with squamous carcinoma of the oral tongue?* *Head Neck*. 1998;20:138-44.
- 36 Calearo C, Magno L, Bignardi L. *la programmazione terapeutica per i tumori maligni epiteliali della parotide*. *Acta Otorhinol Ital* 1985;5:209-16.
- 37 Cantù G, Cardani G, Bimbi G. *Trattamento integrato delle neoplasie dei seni paranasali*. In: Banfi A, Lattuada A, Santoro A, Zucali R, eds. *Radioterapia e trattamenti integrati*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana 1988:141-153.
- 38 Cantù G, Mattavelli F, Salvatori P, Pizzi N, Guzzo M. *Combined transfacial and infratemporal approaches for T3-T4 malignant maxillary tumors*. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 1995;15:345-54.
- 39 Cantù G, Pizzi N, Mattavelli F, Salvatori P, Nardo L. *Carcinomi naso-sinusali*. In: Chiesa F, Squaredrelli Saraceno M, eds. *Fattori prognostici in oncologia cervico-facciale*. Pisa: Pacini Ed. 1998;17-27.
- 40 Carlon G, Serafini I. *Il grading di malignità nel carcinoma epidermoide della laringe*. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 1985;5(Suppl 10):1-48.
- 41 Carlon G. *Il problema del grading istologico nel carcinoma della laringe*. *Atti giornate vittoriesi di laringologia*, Vittorio Veneto 1984:83-94.
- 42 Cellai E, Olmi P, Chiavacci A, Giannardi G, Fagnoli R, Villari N, et al. *Computed tomography in nasopharyngeal carcinoma: Part II: Impact on survival*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990;19:1177-82.
- 43 Cerezo L, Millan I, Torre A, Aragon G, Otero J. *Prognostic factors for survival and tumor control*

- in cervical lymph node metastases from head and neck cancer. A multivariate study of 492 cases. *Cancer* 1992;69:1224-34.
- 44 Chan AT, Teo PM, Leung TV. A prospective randomized study of chemotherapy adjunctive to definitive radiotherapy in advanced nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;33:569-77.
- 45 Chen AY, Matson LK, Roberts D, Goepfert H. The significance of comorbidity in advanced laryngeal cancer. *Head Neck* 2001;23:566-72.
- 46 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.
- 47 Chiesa F, Squadrelli Saraceno M. *Fattori prognostici in oncologia cervico-facciale*. Pisa: Pacini Editore 1998.
- 48 Chin R, Fisher RJ, Smee RI, Barton MB. Oropharyngeal cancer in elderly. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;32:1007-16.
- 49 Chone CT, Crespo AN, Rezende AS, Carvalho DS, Altemani A. Neck lymph node metastases to the posterior triangle apex: evaluation of clinical and histopathological risk factors. *Head Neck* 2000;22:564-71.
- 50 Chua DTT, Sham JST, Kwong DLW. Prognostic value of paranasopharyngeal extension of nasopharyngeal carcinoma. A significant factor in local control and distant metastasis. *Cancer* 1996;78:202-10.
- 51 Chung G, Streyker JA, Abt AB. Histologic grading in clinical evaluation of laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol* 1980;106:623-4.
- 52 Conley J, Dingman D. Adenoid cystic carcinoma in the head and neck (cilindroma). *Arch Otolaryngol* 1974;100:81-90.
- 53 Cortesina G. *Oncogeni e carcinogenesi dei carcinomi cervico-cefalici*. Torino: Edizione Minerva Medica 2002.
- 54 Crispino S, Ghezzi P, Ponticelli P. Carcinoma della regione tonsillare: contributo della chemioterapia. In: Caroggio A, Barberi V e Pedroni M, eds. *Fattori prognostici e programmazione terapeutica nel carcinoma della regione tonsillare*. Reggio Emilia: Edizioni Technograf 1994:115-9.
- 55 Davidson BJ, Root WA, Trock BJ. Age and survival from squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Head Neck* 2001;23:273-9.
- 56 De Meester W, Cancemi G, Fiorentini R, Bocci N, Spediacci G, Graziani P. Neoplasie dell'ipofaringe. In: Chiesa F, Squadrelli Saraceno M, eds. *Fattori prognostici in oncologia cervico-facciale*. Pisa: Pacini Editore 1998:49-55.
- 57 De Rosa G, D'Angelo L, Motta G jr. La reazione stromale quale parametro morfologico di valutazione prognostica nel carcinoma della laringe. *Acta Otorinolaringol Ital* 1984;3:523-5.
- 58 De Rosa G, Donofrio V, Vecchione R, Cali A. Morphological parameters of the prognostic evaluation of laryngeal cancer. *Pathologica* 1984;76:211-25.
- 59 De Stefani A, Forni G, Ragona R, Cavallo G, Bussi M, Usai A, et al. Improved survival with perilymphatic interleukin 2 in patients with resectable squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Cancer* 2002;95:90-7.
- 60 De Stefani A, Valente G, Forni G, Lerda W, Ragona R, Cortesina G. Treatment of oral cavity and oropharynx squamous cell carcinoma with perilymphatic interleukin-2: clinical and pathologic correlations. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1996;19:125-33.
- 61 De Stefani A, Magnano M, Bussi M, Cravero L, Lerda W, Usai A, et al. Identification of clinical, biological and prognostic factors in recurring squamous cell carcinoma of the head and neck. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 1997;17:219-24.
- 62 De Stefani A, Valente G, Forni G, Lerda W, Ragona R, Cortesina G. Treatment of oral cavity and oropharynx squamous cell carcinoma with perilymphatic interleukin-2: clinical and pathologic correlations. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1996;19:125-33.
- 63 Dimery IW, Hong WK. Overview of combined modality therapies for head and neck cancer. *J NCI* 1993;85:95-11.
- 64 Dreyfuss AI, Clark JR. Analysis of prognostic factors in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Hematol Oncol Clin North Am* 1991;5:701-12. Review.
- 65 Easson EC, Russel MH. *The curability of cancer in various sites*. Baltimore: Williams and Wilkins 1978.

- 66 Ellis G, Auclair P, Gnepp D. *Surgical pathology of the salivary glands*. WB Saunders Company 1991.
- 67 Eneroth CM. *Facial nerve paralysis: a criterion of malignancy in parotid tumors*. Arch Otolaryngol 1972;95:300-4.
- 68 Fattori B, Ghilardi PL, Marchetti G. *Valutazione immunoistochimica dell'infiltrato stromale nel carcinoma della laringe*. Atti LXXVII Congresso Nazionale SIO, Stresa 1990:317-20.
- 69 Ferlito A. *Cancer of the larynx. II Vol*. Raven Press 2000, pag. 115.
- 70 Ferrero V. *L'infiltrato peri ed intratumorale nel carcinoma laringeo: studio immunoistochimico*. Atti LXXVII Congresso SIO 1990:314-7.
- 71 Ferrero V, Palonta F, Preti G, Albera R, Cavalot AL, Cortesina G. *Il ritardo diagnostico nel carcinoma laringeo*. In: *Il ritardo diagnostico del carcinoma laringeo*. Ed. Omega 2002:5-26.
- 72 Foote RL, Olsen KD, Davis DL, Buskirk SJ, Stanley RJ, Kunselman SJ, et al. *Base of the tongue carcinoma : patterns of failure and recurrence after surgery alone*. Head Neck 1993;15:300-7.
- 73 Fornasari V. *Neoplasie del cavo orale*. In: Chiesa F, Squadrelli Saraceno M, eds. *Fattori prognostici in oncologia cervico-facciale*. Pisa: Pacini Ed. 1998:11-17.
- 74 Frankenthaler RA, el-Naggar AK, Ordonez NG, Miller TS, Batsakis JG. *High correlation with survival of proliferating cell nuclear antigen expression in mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland*. Otolaryngol Head Neck Surg 1994;11:460-6.
- 75 Frankenthaler RA, Luna MA, Lee SS, Ang KK, Byers RM, Guillaumondegui OM, et al. *Prognostic variables in parotid gland cancer*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1991;117:1251-6.
- 76 Fu K. *Integration of chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in head and cancer*. In: Johnson JT, Didokolar MS, eds. *Head and neck cancers, volume III*. Amsterdam: Excerpta Medica 1993:17-25.
- 77 Fukano H, Matsuura H, Hasegawa Y, Nakamura S. *Depth of invasion as a predictive factor for cervical lymph node metastasis in tongue carcinoma*. Head Neck 1997;19:205-10. Review.
- 78 Gadeberg CC, Hjelm-Hansen, Sogaard H, Elbrond O. *Malignant tumours of the paranasal sinuses and nasal cavity. A series of 180 patients*. Acta Radiol Oncol 1984;23:181-7.
- 79 Gallo O. *La reazione flogistica nei carcinomi epidermoidi della laringe. Studio morfologico e funzionale di alcune sottopopolazioni cellulari*. Acta Otorhinolaryngol Ital 1988;8:557-73.
- 80 Gamel JW, Jones AS. *Squamous carcinoma of the head and neck: cured fraction and median survival time as functions of age, sex, histologic type, and node status*. Br J Cancer 1993;67:1071-5.
- 81 Gardani G, Valvo F, Kenda R. *Risultati della radioterapia transcutanea esclusiva nel trattamento delle neoplasie dell'orofaringe*. Radiol Med 1992;84:114-22.
- 82 Garden AS, El-Naggar AK, Morrison WH, Callender DL, Ang KK, Peters LJ. *Postoperative radiotherapy for malignant tumors of the parotid gland*. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1997;37:79-85.
- 83 Garden AS, Weber RS, Morrison WH, Ang KK, Peters LJ. *The influence of positive margins and nerve invasion in adenoid cystic carcinoma of the head and neck treated with surgery and radiation*. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995;32:619-26.
- 84 Geara FB, Glisson BS, Sanguineti G, Tucker SL, Garden AS, Ang Kk, et al. *Induction chemotherapy followed by radiotherapy versus radiotherapy alone in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma: results of a matched cohort study*. Cancer 1997;79:1279-86.
- 85 Geara FB, Sanguineti G, Tucker SL, Garden AS, Ang KK, Morrison WH, et al. *Carcinoma of the nasopharynx treated by radiotherapy alone: determinants of distant metastasis and survival*. Radiother Oncol 1997;43:53-61.
- 86 Gehanno P, Enaux M, Barry B, Depondt J, Guedon C. *Cancer of the tongue in women. A propos of 40 cases*. Ann Otolaryngol Chir Cervicofaciale 1994;111:265-9.
- 87 Gehanno P, Depondt J, Guendon C. *Primary and salvage surgery for cancer of the tonsillar region: a retrospective study of 120 patients*. Head Neck 1993;15:185-9.
- 88 Giri SPG, Reddy EK, Gemer LS. *Management of advanced squamous cell carcinomas of the maxillary sinus*. Cancer 1992;69:657-61.
- 89 Gluckman JL, Pavelic ZP, Welkoborsky HJ, Mann W, Stambrook P, Gleich L, et al. *Prognostic indicator for squamous cell carcinoma of the oral cavity: a clinicopathologic correlation*. Laryngoscope 1997;107:1239-44.
- 90 Grandi C, Boracchi P, Mezzanotte G, Squadrelli M, Marubini E, Molinari R. *Analysis of prognostic factors and proposal of a new classification for nasopharyngeal cancer*. Head Neck 1990;12:31-40.

- 91 Gregor TR, Oei SS, Hilgers FJ. *Management of cervical metastases in supraglottic cancer*. Ann Otol Rhinol Laryngol 1996;105:845-50.
- 92 Guo M, Rabin BS, Johnson JT, Paradis IL. *Lymphocyte phenotypes at tumor margins in patients with head and neck cancer*. Head Neck Surg 1987;9:265-71.
- 93 Hall SF, Groome PA, Dixon PF. *Does N stage predict survival?* J Otolaryngol 1996;25:296-9.
- 94 Hall SF, Groome PA, Rothwell D, Dixon PF. *Using the TNM system to predict survival in squamous cell carcinoma of the head and neck*. Anticancer Res 1998;18:4777-8.
- 95 Hall SF, Groome PA, Rothwell D. *The impact of comorbidity on the survival of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck*. Head Neck 2000;22:317-22.
- 96 Hall SF, Groome PA, Rothwell D. *Time to first relapse as an outcome and a predictor of survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck*. Laryngoscope 2000;110:2041-6. Head Neck 2000;22:297-302.
- 97 Henk and Langdon. *Malignant Tumours of the Oral Cavity*. London: Edward Arnold 1985.
- 98 Hibbert J, Marks NJ, Winter PJH. *Prognostic factors in oral carcinoma and their relation to clinical staging*. Clin Otolaryngol 1983;8:197-203.
- 99 Hinerman RW, Parsons JT, Mendenhall WM, Stringer SP, Cassisi NJ, Million RR. *External beam irradiation alone or combined with neck dissection for base of the tongue carcinoma: an alternative to primary surgery*. Laryngoscope 1994;104:1466-70.
- 100 Horee W. *Adenoid cystic carcinoma of the maxilla*. Arch Otolaryngol 1974;100:469-72.
- 101 101. Horiot JC, Le Fur R, N' Guyen T. *Hyperfractionation versus conventional fractionation in oropharyngeal carcinoma : final analysis of a randomized trial of the EORTC cooperative group of radiotherapy*. Radiother Oncol 1992;25:231-41.
- 102 International Nasopharynx Cancer Study Group. *Preliminary results of a randomized trial comparing neoadjuvant chemotherapy (cisplatin, epirubicin, bleomycin) plus radiotherapy vs radiotherapy alone in stage IV (> N2, M0) undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: a positive effect on progression-free survival*. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1996;35:463-9.
- 103 Jacobs C, Goffinet DR, Goffinet L, Kohler M, Fee WE. *Chemotherapy as a substitute for surgery in the treatment of advanced respectable head and neck cancer*. A report from the Northern California oncology Group Cancer 1987;60:178-83.
- 104 Janot F, Klijanienko J, Russo A, Mamet JP, de Braud F, El-Naggar AK, et al. *Prognostic value of clinicopathological parameters in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective analysis*. Br J Cancer 1996;73:531-8.
- 105 Jaullery C, Dubray B, Brunin F. *Prognostic value of tumor regression during radiotherapy for head neck cancer: prospective study*. Int J Rad Oncol Biol Phys 1995;33:271-9.
- 106 Jiang GL, Ang KK, Peters LG. *Maxillary sinus carcinomas: natural history and results of postoperative radiotherapy*. Radiother Oncol 1991;21:193-200.
- 107 Johnson JT, Myers EN, Bedetti CD, Barnes EL, Schramm VL Jr, Thearle PB. *Cervical lymph node metastases. Incidence and implications of extracapsular carcinoma*. Arch Otolaryngol 1985;111:534-7.
- 108 Jones AS. *Prognosis in Mouth Cancer: Tumor Factors*. Eur J Cancer B Oral Oncol 1994;30B:8-15.
- 109 Kane W, McCaffrey TV, Olsen KD, Lewis JE. *Primary parotid malignancies: A clinical and pathological review*. Arch Otolaryngol ead Neck surg 1991;117:301-15.
- 110 Karp DD, Vaughan CW, Carter R, Willett B, Heeren T, Calarese P, et al. *Larynx preservation using induction chemotherapy plus radiation therapy as an alternative to laryngectomy in advanced head and neck cancer. A long-term follow-up report*. Am J Clin Oncol 1991;14:273-9.
- 111 Kelley DJ, Spiro RH. *Management of the neck in parotid carcinoma*. Am J Surg 1996;1172:695-7.
- 112 Koch WM. *Maxillary nodal metastases in head and neck cancer*. Head Neck 1999;21:269-72.
- 113 Kondo M, Ogawa K, Inuyama Y, Yamashita S, Tominaga S, Shigematsu N, et al. *Prognostic factors influencing relapse of squamous cell carcinoma of the maxillary sinus*. Cance 1985;55:190-6.
- 114 Koukourakis MI, Whitehose RM, Giatromanolaki A, Saunders M, Kaklamanis L. *Predicting distant failure in nasopharyngeal cancer*. Laryngoscope 1996;106:765-71.
- 115 Kowalski LP, Bagietto R, Lara JR, Santos RL, Tagawa EK, Santos IR. *Factors influencing contralateral lymph node metastasis from oral carcinoma*. Head Neck 1999;21:104-10.
- 116 Kowalski LP, Bagietto R, Lara JR, Santos RL, Silva JF Jr, Magrin J. *Prognostic significance of the distribution of neck node metastasis from oral carcinoma*. Head Neck. 2000;22:207-14.

- 117 Kummer E, Rasch CR, Keus RB, Tan IB, Balm AJ. *T stage as prognostic factor in irradiated localized squamous cell carcinoma of the nasal vestibule*. *Head Neck* 2002;24:268-73.
- 118 Kus J, Miodonski AJ, Olszewski E, Sekula J. *Cellular elements of the immune system in the larynx cancer; SEM study*. *Folia Histochem Cytobiol* 1985;23:155-8.
- 119 Kus J, Miodonski AJ, Olszewski E, Sekula J. *SEM observations on the cellular transmigration through the wall of blood vessels in cancer of the human larynx*. *Folia Histochem Cytobiol* 1985;23:43-9.
- 120 Kwong D, Sham J, Choy D. *The effect of loco-regional control on distant metastatic dissemination in carcinoma of the nasopharynx: an analysis of 1301 patients*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;30:1029-36.
- 121 Lacy PD, Piccirillo JF, Merritt MG, Zequeira MR. *Head and neck squamous cell carcinoma: better to be young*. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;122:253-8.
- 122 Langdon JD, Harvey PW, Rapidis AD, Patel MF, Johnson NW, Hopps R. *Oral cancer: the behaviour and response to treatment of 194 cases*. *J Maxillofac Surg* 1977;5:221-37.
- 123 Lartigau E, Eschwege F, Lusinchi A, Wibault P, Luboinski B. *Chemioterapia d'induction dans les tumeurs T1 et T2 de la region amigdalienne*. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 1993;110:42-5.
- 124 Laudoyer YM. *Chemioterapia premier et conservation laryngee dans les cancers hypopharynges et larynges*. These Medicine Nice 1992.
- 125 Lee WR, Mendenhall WM, Parsons JT, Million RR, Cassisi NJ, Stringer SP. *Carcinoma of the tonsillar region: a multivariate analysis of 243 patients treated with radical radiotherapy*. *Head Neck* 1993;15:283-8.
- 126 Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, van der Waal I, Snow GB. *Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor*. *Cancer* 1994;73:187-90.
- 127 Lefebvre JL. *Étude prospective et pronostique des carcinomas epidermoides de la region amygdalienne (Étude EPERA)*. In: Caroggio A, Barberi V, Pedroni E, eds. *Fattori prognostici e programmazione terapeutica nel carcinoma della regione tonsillare*. Edizioni Technograf-Reggio Emilia 1994:165-70.
- 128 Leon X, Quer M, Burgues J, Abello P, Vega M, de Andres L. *Prevention of stomal recurrence*. *Head Neck* 1996;18:54-9.
- 129 Leon X, Quer M, Orus C, del Prado Venegas M, Lopez M. *Distant metastases in head and neck cancer patients who achieved loco-regional control*. *Head Neck* 2000;22:680-6.
- 130 Lindelov B, Hansen HS. *The impact of lymph node metastases on the results of treatment by primary radiotherapy and secondary surgery in oropharyngeal cancer*. *Acta Oncol* 1995;34:965-8.
- 131 Liu M, Weynand B, Delos M, Barbaix E. *Prognostic factors in squamous cell carcinomas of the head and neck*. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1999;53:155-60. Review.
- 132 Loree TR, Strong EW. *Significance of positive margins in oral cavity squamous cell carcinoma*. *Am J Surg* 1990;160:410-4.
- 133 Looser KG, Shah JP, Strong EW. *The significance of positive margins in surgically resected epidermoid carcinomas*. *Head Neck Surg* 1978;1:107-11.
- 134 Mac Comb WS, Fletcher GH. *Cancer of the head and neck*. Baltimore: Williams and Wilkins 1967.
- 135 Machtay M, Perch S, Markiewicz D, Thaler E, Chalian A, Goldberg A, et al. *Combined surgery and postoperative radiotherapy for carcinoma of the base of tongue: analysis of treatment outcome and prognostic value of margin status*. *Head Neck* 1997;19:494-9.
- 136 Magnano M, Bongioannini G, Lerda W, Canale G, Tondolo E, Bona M, et al. *Lymphnode metastasis in head and neck squamous cells carcinoma: multivariate analysis of prognostic variables*. *J Exp Clin Cancer Res* 1999;18:79-83.
- 137 Magnano M, Bussi M, De Stefani A, Milan F, Lerda W, Ferrero V, et al. *Prognostic factors for head and neck tumor recurrence*. *Acta Otolaryngol* 1995;115:833-8.
- 138 Magnano M, De Stefani A, Lerda W, Usai A, Ragona R, Bussi M, et al. *Prognostic factors of cervical lymph node metastasis in head and neck squamous cell carcinoma*. *Tumori* 1997;83:922-6.
- 139 Magnano M, Gervasio CF, Cravero L, Orecchia R, Beltramo G, Ragona R, et al. *I carcinomi della base della lingua: contributo casistico*. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 1995;15:416-23.

- 140 Mak-Kregar S, Hilgers FJ, Levendag PC, Manni JJ, Hart AA, Visser O, et al. *Disease - specific survival and locoregional control in tonsillar carcinoma*. Clin Otolaryngol 1996;21:550-56.
- 141 Marandas P, Marandas N. *Tumeurs malignes de l'oropharynx: epidemiologic, diagnostic, traitement*. Rev Practicien 1995;45:623-8.
- 142 Martin-Granizo R, Rodriguez-Campo F, Naval L, Diaz Gonzalez FJ. *Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients younger than 40 years*. Otolaryngol Head Neck Surg 1997;117:268-75.
- 143 Mattavelli F, Salvatori P, Grandi C. *Carcinoma adenoideo-cistico: storia naturale ed implicazioni Terapeutiche*. In: Veronesi U, Molinari R, Banfi A, Santoro A, eds. *I tumori della testa e del collo*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana 1990:201-3.
- 144 Mazzone A, Califano L, Agozzino L, Barillari U, Malafronte G, Costa G. *Correlazioni anatomicopatologiche e cliniche nel carcinoma squamoso della laringe e dell'ipofaringe*. Acta Otorhinolaryngol Ital 1990;10:111-9.
- 145 McGravan MH, Bauer WC, Ogura JH. *The incidence of cervical lymph node metastases from epidermoid carcinoma of the larynx and their relationship to certain characteristics of the primary tumor*. Cancer 1961;14:55-66.
- 146 McLaughlin MP, Mendenhall WM, Mancuso AA, Parsons JT, McCarty PJ, Cassisi NJ, et al. *Retropharyngeal adenopathy as a predictor of outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck*. Head Neck 1995;17:190-8.
- 147 Moose BD, Kelly MD, Levine PA, Constable WC, Cantrell RW, Larner JM. *Definitive radiotherapy for T1 and T2 squamous cell carcinoma of the tonsil*. Head Neck 1995;17:334-8.
- 148 Navone R, Pisani P, Toti R. *Caratterizzazione immunoistochimica su sezioni in paraffina dagli infiltrati linfocitari in carcinomi faringei. Correlazioni prognostiche. Immunoterapia dei tumori della testa e del collo*. Novara 1989.
- 149 Netterville JL, Sinard RJ, Bryant GL Jr, Burkey BB. *Delayed regional metastasis from midfacial squamous carcinomas*. Head Neck 1998;20:328-33.
- 150 Nicolai P, Redaelli de Zinis LO, Tomenzoli D, Barezzani MG, Bertoni F, Bignardi M, et al. *Prognostic determinants in supraglottic carcinoma: univariate and Cox regression analysis*. Head Neck 1997;19:323-34.
- 151 O'Brien CJ, Soong SJ, Herrera GA, Urist MM, Maddox WA. *Malignant salivary tumors-analysis of prognostic factors and survival*. Head Neck Surg 1986;9:82-92.
- 152 Ogura I, Amagasa T, Miyakura T. *Correlation between tumor consistency and cervical metastasis in tongue carcinoma*. Head Neck 2000;22:229-33.
- 153 Ohngren LG. *Malignant tumors of the maxillo-ethmoidal region*. Acta Otolaryngologica 1993;19:1-476.
- 154 Oliver AJ, Helfrick JF, Gard D. *Primary oral squamous cancer carcinoma: a review of 92 cases*. J Oral Maxillofacial Surg 1996;54:949-54.
- 155 Pastore A, Merlo R, Chiarello G, Calearo C. *Il problema linfonodale nei tumori epiteliali maligni della parotide*. Acta Otorhinol Ital 1995;15:87-90.
- 156 Paulino AC, Fisher SG, Marks JE. *Is prophylactic neck irradiation indicated in patients with squamous cell carcinoma of the maxillary sinus?* Int J Radiat Oncol Biol Phys 1997;39:283-9.
- 157 Percodani J, Woisard V, Serrano E, Pessey JJ. *La chimiotherapie d'induction dans le carcinomes epidermoides des VADS. A propos d'un etude retrospective sur 293 patients*. Rev Laryngol Otol Rhinol 1996;117:27-34.
- 158 Perez CA, Devineni V, Marcial-Vega V, Marks JE, Simpson JR, Kucik N. *Carcinoma of the nasopharynx: factors affecting prognosis*. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1992;23:271-80.
- 159 Peters LJ, Goepfert H, Ang KK, Byers RM, Maor MH, Guillemondegui O, et al. *Evaluation of the dose for postoperative radiation therapy of head and neck cancer: first report of prospective randomised trial*. Int J Rad Oncol Biol Phys 1993;26:3-11.
- 160 Pfister DG, Strong E, Harrison L, Haines IE, Pfister DA, Sessions R, et al. *Larynx preservation with combined chemotherapy and radiation therapy in advanced but resectable head and neck cancer*. J Clin Oncol 1991 ;9:850-9.
- 161 Piemonte M, Cortesina G. *Consensus Conference sul cancro del cavo orale. Strategie diagnostiche e terapeutiche*. 11-13 aprile 2002.
- 162 Pierri I, Cordone G, Rogna S, Piccardo C, Barabino A, Indiveri F. *T-lymphocytes phenotype and functions in patients with head and neck cancer*. Laryngoscope 1985;95:577-81.
- 163 Pinsolle J, Pinsolle V, Majoufre C, Duroux S, Demeaux H, Siberchicot F. *Prognostic value of hi-*

- stologic findings in neck dissections for squamous cell carcinoma.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1997;123:145-8.
- 164 Pitman KT, Johnson JT, Wagner RL, Myers EN. *Cancer of the tongue in patients less than forty.*
- 165 Pitman KT, Johnson JT. *Skin metastases from head and neck squamous cell carcinoma: incidence and impact.* Head Neck 1999;21:560-5.
- 166 Pradier R, Gonzales A, Matos E, Loria D, Adan R, Saco P, et al. *Prognostic factors in laryngeal carcinoma. Experience in 296 male patients.* Cancer 1993;71:2472-6.
- 167 Pradier RN, Califano L, Saco P. *Cancer of the oropharynx.* Proceedings 4th International Conference on Head and Neck Cancer 1996;866-72.
- 168 Recondo G, Armand JP, Tellez-Bernal E, Domenge C, Belehradek M, De Vathaire F, et al. *Recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: a clinical, univariate and multivariate analysis of response and survival with cisplatin-based chemotherapy.* Laryngoscope 1991;101:494-501.
- 169 Regueiro CA, Aragon G, Millan I, Valcarcel FJ, de la Torre A, Magallon R. *Prognostic factors for local control, regional control and survival in oropharyngeal squamous cell carcinoma.* Eur J Cancer 1994;30A:2060-7.
- 170 Reid BC, Alberg AJ, Klassen AC, Samet JM, Rozier RG, Garcia I, et al. *Comorbidity and survival of elderly head and neck carcinoma patients.* Cancer 2001;92:2109-16.
- 171 Renehan A, Gleave E, Hancock BD, Smith P, McGurk M. *Long term follow-up of over 1000 patients with salivary gland tumors treated in a single center.* Brit J Surg 1996;83:1750-4.
- 172 Resnick MJM, Uhlman D, Niehans GA, Gapany M, Adams G, Knapp D, et al. *Cervical lymphnode and survival in laryngeal carcinoma: prognostic factors.* Ann Otol Rhinol Laryngol 1995;104:685-94.
- 173 Richard JM, Sancho-Garnier H, Micheau C, Saravane D, Cachin Y. *Prognostic factors in cervical lymph node metastasis in upper respiratory and digestive tract carcinomas: study of 1,713 cases during a 15-year period.* Laryngoscope 1987;97:97-101.
- 174 Rinaldi Ceroni A, Galli V. *Criteri di radicalità nei tumori testa e collo.* Acta Otorhinolaryngol Ital 2000;20:375-9.
- 175 Robin PE, Powell DJ. *Regional node involvement and distant metastases in carcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses.* J Laryngol Otol 1980;94:301-9.
- 176 Roselli R, Piantanida R, Spriano G. *Neoplasie dell'orofaringe in Chiesa F., Squadrelli Saraceno M.* Fattori prognostici in oncologia cervico-facciale. Pacini Ed. Pisa 1998;35-49
- 177 Rube C, Micke O, Grevers G, Rohloff R, Kaufmann H, Busch M, et al. *Primary radiotherapy of laryngeal carcinoma. An analysis of the therapeutic results and of the relapse behavior in 283 patients.* Strahlenther Onkol. 1997;173:83-90.
- 178 Sakata K, Aoki Y, Karasawa K, Hasezawa K, Muta N, Nakagawa K, et al. *Radiation therapy in early glottic carcinoma: uni- and multivariate analysis of prognostic factors affecting local control.* Int J Radiat Oncol Biol Phys 1994;30:1059-64.
- 179 Sanguineti G, Geara FB, Garden AS, Tucker SL, Ang KK, Morrison WH, et al. *Carcinoma of the nasopharynx treated by radiotherapy alone: determinants of distant metastasis and survival.* Radiother Oncol 1997;43:53-61.
- 180 Schantz SP, Savage HE, Racz T, Taylor DL, Sacks PG. *Natural killer cells and metastases from pharyngeal carcinoma.* Am J Surg 1989;158:361-6.
- 181 Schuller DE, McGuiert WF, McCabe BF, Young D. *The prognostic significance of metastatic cervical lymph nodes.* Laryngoscope 1980;90:557-70.
- 182 Schuller DE. *Lymphocyte phenotype in patients with head and neck cancer.* Laryngoscope 1983;95:377-81.
- 183 Sebilleau P. *Les formes cliniques du Cancer du sinus maxillarie.* Annales malades d'oreille, du larynx, nez et pharynx 1906;32:430-50.
- 184 Sham JST, Choy D, Choi PNK. *Nasopharyngeal carcinoma: the significance of neck node involvement in relation to the pattern of distant failure.* Br J Radiol 1990;63:108-13.
- 185 Sham JST, Choy D. *Prognostic factors of nasopharyngeal carcinoma: a review of 759 patients.* Br J Radiol 1990;63:51-8.
- 186 Shingaki S, Suzuki I, Kobayashi T, Nakajima T. *Predicting factors for distant metastases in head and neck carcinomas: an analysis of 103 patients with locoregional control.* J Oral Maxillofac Surg 1996;54:853-7.

- 187 Singh B, Bhaya M, Zimble M, Stern J, Roland JT, Rosenfeld RM, et al. *Impact of comorbidity on outcome of young patients with head and neck squamous cell carcinoma*. *Head Neck* 1998;20:1-7.
- 188 Sisk EA, Bradford CR, Jacob A, Yian CH, Staton KM, Tang G, et al. *Human papillomavirus infection in «young» versus «old» patients with squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Head Neck* 2000;22:649-57.
- 189 Sisson GA, Toriumi DM, Atiyah RA. *Paranasal sinus malignancy: a comprehensive update*. *Laryngoscope* 1989;99:143-50.
- 190 Smit M, Balm AJ, Hilgers FJ, Tan IB, et al. *Pain as sign of recurrent disease in head and neck squamous cell carcinoma*. *Head Neck* 2001;23:372-5.
- 191 Spiro JJ, Wang CC, Montgomery WW. *Carcinoma of the parotid gland*. *Cancer* 1993;71:2699-705.
- 192 Spiro RH, Guillaumondegui O Jr, Paulino AF, Huvos AG. *Pattern of invasion and margin assessment in patients with oral tongue cancer*. *Head Neck* 1999;21:408-13.
- 193 Spiro RH. *Salivary neoplasms: overview of a 35-year experience with 2.807 patients*. *Head Neck Surg* 1986;177-84.
- 194 Spriano G, Piantanida R, Boschini P. *Il carcinoma della regione tonsillare: esperienza dell'Ospe-
dale Multizonale di Varese*. In: Caroggio A, Barberi V, Pedroni E, eds. *Fattori prognostici e pro-
grammazione terapeutica nel carcinoma della regione tonsillare*. Edizioni Technograf-Reggio
Emilia 1994:247-58.
- 195 Squadrelli Saraceno M, Bimbi G, Dallari S. *Neoplasie delle ghiandole salivari*. In: Chiesa F, Squa-
drelli Saraceno M, eds. *Fattori prognostici in oncologia cervico-facciale*. Pisa: Pacini Editore
1998:73-83.
- 196 Succo G, Valente G, Airoidi M, Gabriele P, Bramardi F, DiLisi D, et al. *Neoplasie della laringe*. In:
Chiesa F, Squadrelli Saraceno M, eds. *Fattori prognostici in oncologia cervico-facciale*. Pisa: Pa-
cini Editore 1998:55-73.
- 197 Tamplenizza P, Ottaviani F, Sinis C. *Le cellule di Langherans nella laringe umana*. *Otorinolarin-
gologia* 1986;36:13-25.
- 198 Tamplenizza P, Ottaviani R. *Le cellule di Langherans nel carcinoma laringeo*. *Otorinolaryngol*
1986:131-7.
- 199 Tennvall J, Wennerberg J, Anderson H, Baldetorp B, Ferno M, Willen R. *DNA analysis as a pre-
dictor of the outcome of induction chemotherapy in advanced head and neck carcinomas*. *Arch*
Otolaryngol Head Neck Surg 1993;119:867-70.
- 200 Teo P, Lee WM, Yu P. *The prognostic significance of parapharyngeal tumour involvement in na-
sopharyngeal carcinoma*. *Radiother Oncol* 1996;39:209-21.
- 201 Teo P, Leung SF, Lee WY. *Prognostic factors in nasopharyngeal carcinoma investigated by com-
puter tomography – an analysis of 659 patients*. *Radiother Oncol* 1992;23:79-93.
- 202 Teo P, Yu P, Lee WY, Leung SF, Kwan WH, Yu KH, et al. *Significant prognosticators after primary
radiotherapy in 903 nondisseminated nasopharyngeal carcinoma evaluated by computer tomo-
graphy*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1996;36:291-304.
- 203 Thawley SE, Panje WR. *Comprehensive management of head and neck tumors: tumors of the sa-
livary gland*. WB Saunders Company 1987.
- 204 UICC. *TNM Classification of Malignant Tumors. Fifth Edition*. New York: Wiley-Liss 1997.
- 205 Wang C, Montgomery W, Efid J. *Local control of oropharyngeal carcinoma by irradiation alone*.
Laryngoscope 1995;105:529-33.
- 206 Weber AL, Stanton AC. *Malignant tumors of the paranasal sinuses: radiologic, clinical, and hi-
stopathologic evaluation of 200 cases*. *Head Neck Surg* 1984;6:761-76.
- 207 Wedman J, Balm AJ, Hart AA, Loftus BM, Hilgers FJ, Gregor RT, et al. *Value of resection of pul-
monary metastases in head and neck cancer patients*. *Head Neck* 1996;18:311-6.
- 208 Woolgar JA, Scott J. *Prediction of cervical lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of
the tongue/floor of mouth*. *Head Neck* 1995;17:463-72.
- 209 Yuen PW, Lan KY, Chan ACL, Wei WI, Lam LK. *Clinicopathological analysis of local spread of
carcinoma of the tongue*. *Am J Surg* 1998;175:242-4.
- 210 Zatterstrom UK, Wennerberg J, Ewers SB, Willen R, Attewell R. *Prognostic factors in head and
neck cancer: histologic grading, DNA ploidy, and nodal status*. *Head Neck* 1991;13:477-87.
- 211 Zitsch RP 3rd, Lee BW, Smith RB. *Cervical lymph node metastases and squamous cell carcinoma
of the lip*. *Head Neck* 1999;21:447-53.

IV. FATTORI MOLECOLARI COINVOLTI NELLA PROGRESSIONE DEI CARCINOMI CERVICO-FACCIALI

T. Martone, L. Pignataro*, F. Palonta, P. Rosso, G. Cortesina

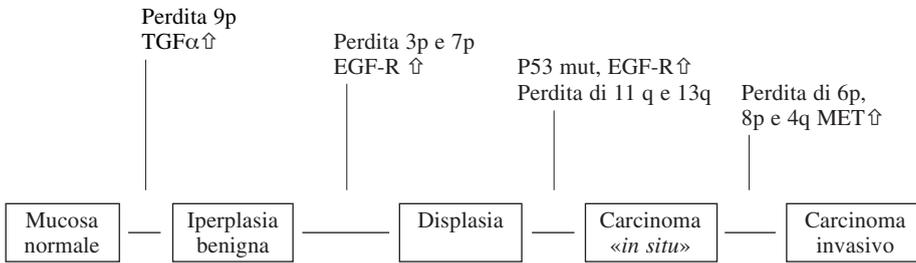
MODELLO MULTIFASICO DELLA PROGRESSIONE NEOPLASTICA DEI CARCINOMI CERVICO-FACCIALI

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 metastatizzazione, rappresenta l'ultima tappa della progressione neoplastica in cui si «selezionano» solo quelle cellule, portatrici di alterazioni geniche stabili, in grado di superare numerose barriere naturali e compiere una serie di tappe (distacco dalla massa cellulare di origine, ingresso in circolo, uscita dal circolo) che culminano nella formazione di un «clone metastatico» in un microambiente diverso da quello normale.

Come per il carcinoma del colon-retto, esempio paradigmatico di progressione tumorale multifasica⁷³, anche per i carcinomi cervico-facciali è stato proposto un modello di progressione neoplastica multifasica¹⁰ secondo il quale, ai diversi e ben definiti stadi clinici e istopatologici attraverso cui la malattia evolve, corrisponderebbero lesioni genetiche caratteristiche.

II Clinica ORL, Università di Torino;

* I Clinica ORL, Ospedale Maggiore Policlinico IRCCS, Università di Milano



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, 11q, 13q e 17p, regioni dove sono localizzati oncogeni e geni onco-soppressori la cui «attivazione» o «perdita della funzione» 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 della 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 deregolato. Secondo la localizzazione dei loro prodotti proteici, si distinguono quattro gruppi principali di oncogeni:

Fattori di crescita. Ad esempio EGF, IGF, TGF, HGF. Svolgono la loro funzione permettendo alla cellula di progredire dalla fase G₀ alla fase G₁. Agiscono in modo autocrino (cioè la cellula produce il fattore di crescita e lo usa per sé) oppure paracrino (secerne il fattore di crescita che agisce su altre cellule),

Recettori per i fattori di crescita. Sono per lo più recettori per i fattori di crescita a funzione tirosino-chinasica (MET, KIT, ERBB2, EFGR TRK, RET ...) che dopo il legame con il fattore di crescita si autofosforilano ed innescano una serie di reazioni enzimatiche a cascata che culminano con la trasmissione del segnale al nucleo.

Messaggeri intracellulari. A questo gruppo appartengono proteine ad attività enzimatica sia associate alla membrana (ABL, SRC, RAS) che a localizzazione citoplasmatica (RAF, MOS). Appartengono a questo gruppo anche altre numerose proteine con funzione di adattatori cellulari (PI3K, Grb2).

Fattori nucleari e di trascrizione. Cioè componenti che legano direttamente il DNA e controllano la trascrizione di alcuni geni deputati al controllo della proliferazione e differenziamento cellulare (MYC, JUN, FOS).

Al contrario, si definiscono onco-soppressori i geni preposti all'inibizione della proliferazione. Le lesioni genetiche che «inattivano», con conseguente perdita della funzione genica, gli effettori negativi (o soppressori) della proliferazione, svincolano la cellula dai normali meccanismi di controllo negativo della crescita cellulare determinando un «aumento del potenziale proliferativo» della cellula.

Anche i geni onco-soppressori in base alla loro localizzazione cellulare si distinguono in tre gruppi:

Soppressori di membrana. Appartengono a questo gruppo i geni onco-soppressori DCC, GAS1 e GAS3

Soppressori citoplasmatici. APC e GAS2

Soppressori nucleari. p53, Rb, BRCA1.

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).

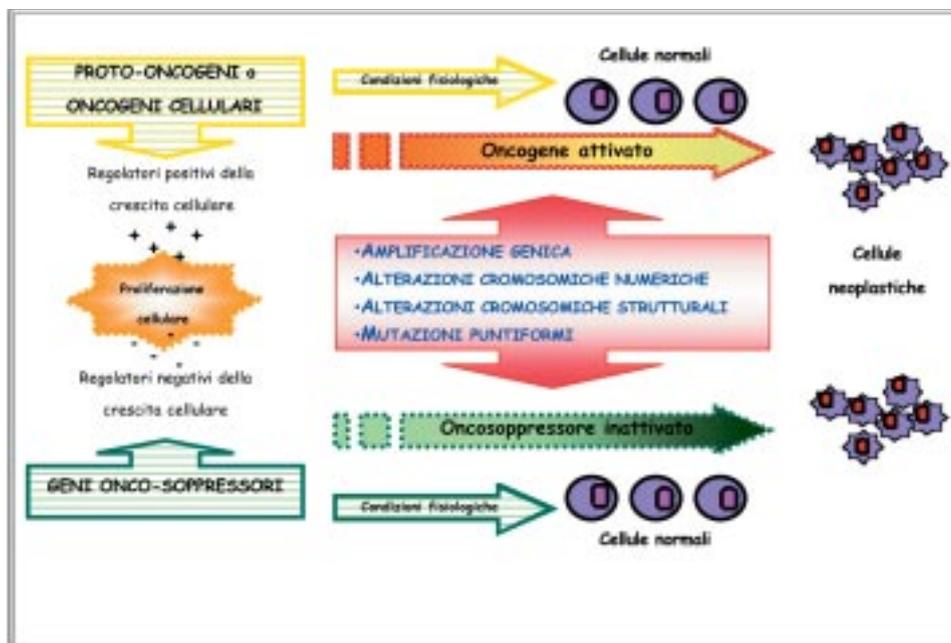


Fig. 1.

Oncogeni e geni onco-soppressori: meccanismi di attivazione e inattivazione.

Meccanismi di attivazione e inattivazione di oncogeni e geni onco-soppressori

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 protooncogeni 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. In particolare, le inversioni si identificano con quelle alterazioni che avvengono in seguito alla rottura di un cromosoma in due punti ed alla conseguente «inversione» del segmento cromosomico situato fra i due punti di rottura prima della sua risaldatura. Nelle traslocazioni invece, poiché le rotture di segmenti cromosomici si verificano su due o più cromosomi, possono dare luogo alla formazione di cromosomi ibridi per unione di segmenti genici che originariamente si trovavano su cromosomi differenti. Proprio l'analisi molecolare dei punti di rottura di questi riarrangiamenti ha permesso di identificare che protooncogeni, già noti o nuovi, sono alterati in seguito a tali alterazioni.

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.

L'instabilità genetica oltre che a grosse anomalie cromosomiche che, come abbiamo appena descritto, comportano la perdita o l'acquisizione di cromosomi e la rottura e riunione di segmenti genici, può essere dovuta anche a mutazioni minori che si identificano con semplici sostituzioni, delezioni e inserzioni di una base o un nucleotide all'interno di un'unica sequenza di DNA. Il risultato di tali mutazioni può essere l'alterata produzione di un prodotto genico sia dal punto di vista qualitativo (proteine tronche e non funzionali o con funzioni alterate) che quantitativo (mancata produzione della proteina).

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.

Alterazioni geniche che si avverano 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.

Proliferazione cellulare: geni che controllano l'ingresso e la progressione delle cellule nel ciclo duplicativo

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-chinasici (Fig. 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 auto-fosforilazione 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 nuovi geni. I geni che codificano per i fattori di crescita o per i loro recettori sono i proto-oncogeni, i quali, «attivati» da alterazioni geniche strutturali, trasmettono il segnale proliferativo in modo deregolato.

I dati attualmente presenti in letteratura dimostrano un'associazione tra espressione aberrante, intesa come aumentata espressione, di alcuni recettori tirosino-chinasici per i fattori di crescita e la progressione neoplastica dei carcinomi squamosi della testa e del collo, in particolare tali evidenze riguardano i recettori della famiglia dell'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) (EGFR/erbB1, erbB2/Her2-neu) ed il recettore MET (Hepatocyte Growth Factor Receptor).

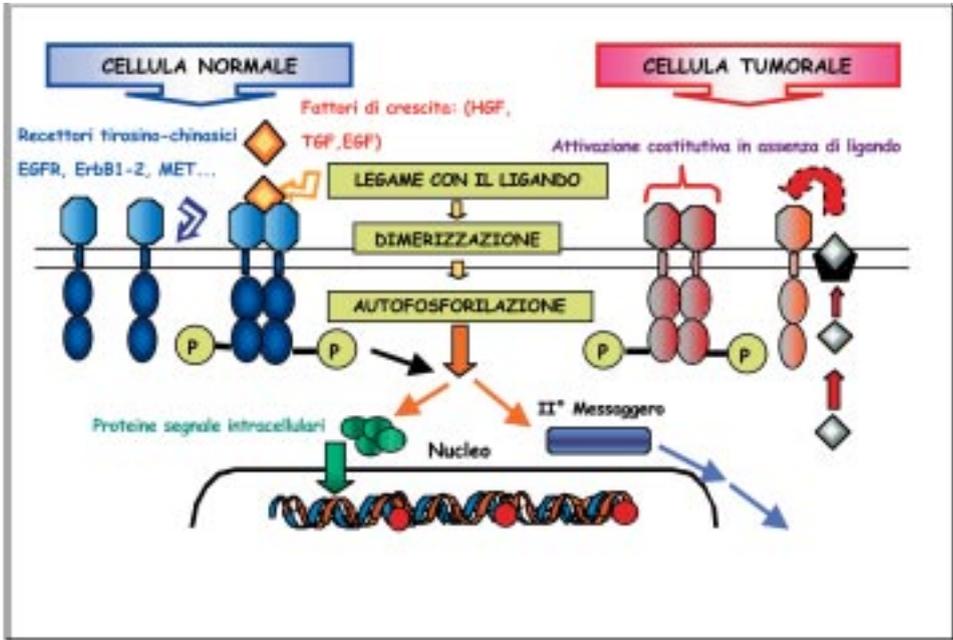


Fig. 2.

Schema di attivazione dei recettori ad attività tirosino-chinasica (modificata e semplificata da Koliba KS, Druker BJ, *Biochimica and Biophysica, Acta* 1997).

EGFR/erbB-1. L'oncogene EGFR, presente nelle cellule normali in singola copia sul cromosoma 7p12, codifica per il recettore del «fattore di crescita epiteliale». Il prodotto codificato dall'oncogene EGFR, la proteina p170, ha una localizzazione trans-membranaria ed è un recettore di tipo tirosino-chinasico. Il legame dei fattori di crescita, EGF e TGF- α , alla porzione extracellulare del recettore causa una dimerizzazione dei recettori presenti sulla membrana con conseguente fosforilazione e attivazione di molecole trasduttrici del segnale che culmina nella trascrizione nucleare di geni che controllano la proliferazione cellulare. Tale recettore svolge un ruolo importante nei processi di sviluppo durante l'embriogenesi. Benché un aumentato livello di EGFR sia riscontrabile in numerose neoplasie umane, l'amplificazione genica non sembra rivestire un ruolo determinante nel suo incremento, mentre sono probabilmente coinvolti l'incremento della trascrizione dell'RNA e l'iperproduzione proteica³⁹.

L'attivazione dell'oncogene EGFR, responsabile della sua iperespressione, sembra essere dovuta a fenomeni di amplificazione genica o alterazioni geniche strutturali a carico del cromosoma 7⁴⁷. L'iperespressione del recettore EGFR, è stata descritta in numerosi tipi di tumore tra cui, tumori mammari²⁴, carcinomi squamosi del polmone³³ e carcinomi squamosi della testa e del collo^{27 60 74}. L'importanza dell'EGFR come potenziale marker prognostico deriva essenzialmente da studi che dimostrano durante le varie fasi della progressione neoplastica⁶⁹ un aumento della sua

espressione, sia come RNA sia come proteina dalla quale può dipendere per la stretta associazione con il potenziale trasformante un fenotipo più aggressivo.

Erb-B2/Her2-neu. L'oncogene Erb-B2 è presente nelle cellule umane normali in singola copia nel cromosoma 17q12. La proteina da esso codificata, la p185, risiede sulla membrana plasmatica ed è un recettore ad attività tirosino-chinasica appartenente alla famiglia dell'EGFR (recettore per il fattore di crescita epiteliale). Sebbene non sia noto il ligando specifico per questo recettore, in seguito al legame dell'EGF si osserva un'attivazione del recettore stesso (dimerizzazione e fosforilazione). L'amplificazione e l'espressione di ERBB-2, sia come mRNA sia come proteina, sono stati ampiamente studiate in biopsie tumorali; in particolare, sono state riscontrate con significativa frequenza nel carcinoma mammario umano, nelle neoplasie del polmone, del tratto gastrointestinale, dell'ovaio e nei carcinomi squamosi della testa e del collo ^{23 17}.

HGF-R/MET. Il prodotto codificato dall'oncogene MET è una proteina transmembrana eterodimerica, con un dominio intracellulare ad attività tirosina chinasica. Essa si identifica con il recettore per l'Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor (HGF/SF). L'HGF/SF era stato inizialmente isolato come «fattore di crescita epatocitario», cioè come mitogeno apparentemente specifico per gli epatociti, presente nel siero dei pazienti o di animali da esperimento a seguito di epatectomia o danno epatico necrogenico. L'attività mitogenica dell'HGF/SF è poi stata estesa a diversi tessuti epiteliali e ai melanociti e all'endotelio. Solo successivamente fu dimostrato che l'Hepatocyte Growth Factor è identico allo Scatter Factor (SF), identificato indipendentemente come un prodotto delle cellule mesenchimali capace di dissociare le cellule epiteliali in coltura e di stimolarne la motilità e l'invasività ⁷². L'identità fra HGF e Scatter Factor, già noto per stimolare la motilità delle cellule in vitro, aveva fatto sospettare fin dalla loro scoperta che il fattore e il suo recettore fossero coinvolti in alcune delle tappe che portano alla metastatizzazione. Numerosi esperimenti su modelli in vitro e in vivo hanno dato sostegno a questa ipotesi. La combinazione, ottenuta sperimentalmente, di iperespressione del recettore e alti livelli del fattore nella stessa cellula, determina la stimolazione costitutiva del recettore per autocrinia, e conferisce tumorigenicità e capacità metastatica alle cellule di origine mesenchimale e «aggiunge» la capacità di dare metastasi a cellule epiteliali trasformate ⁶⁵.

Nei tumori umani a occorrenza spontanea la lesione più frequente dell'oncogene MET è la sua iperespressione. Questa è stata descritta in alcuni tumori dal forte impatto sulla popolazione, come i carcinomi del colon-retto ¹⁹, i tumori pancreatici ²⁰, quelli prostatici ³⁸, e quelli della testa e del collo ¹⁶. Alla sovraespressione si associa l'attività chinasica costitutiva del recettore, dalla quale può dipendere il potenziale trasformante e la stimolazione della motilità e dell'invasività come verificato, per esempio, su linee di carcinoma gastrico e pancreatico. Recentemente sono state trovate mutazioni nel dominio tirosino-chinasico del recettore MET in famiglie con tumori ereditari del rene ⁴⁰. Queste mutazioni sono anche presenti in qualche caso di tumore renale sporadico dello stesso isotipo. Nelle famiglie si associano, seppure raramente, carcinomi del colon retto e mammari. Tali dati dimostrano che il gene MET, attraverso il recettore per cui codifica, e il suo ligando HGF/SF, sia coin-

volto nella patogenesi dei carcinomi, ma soprattutto nella loro progressione verso un comportamento invasivo e metastatico.

Ciclo cellulare: geni che controllano il ciclo duplicativo cellulare

Il ciclo duplicativo di una cellula è suddiviso in due fasi: uno stadio, molto breve, di «divisione cellulare», la fase M (o della mitosi) ed uno stadio più lungo, l'interfase, a sua volta suddiviso in altre tre fasi, la fase S (di sintesi del DNA), la fase G1 (gap1, di intervallo tra fase M e S) e la fase G2 (gap2, di intervallo tra S e M) (Fig. 3). Le cellule che entrano nella fase S sono quelle indirizzate alla mitosi; al contrario, quelle che non si dividono rimangono in uno stato G1 modificato chiamato G0 o di «quiescenza».

Numerose sono le proteine che intervengono nella regolazione del ciclo cellulare, ma il motore del ciclo duplicativo è rappresentato da una famiglia di complessi enzimatici, denominati ciclina/chinasi. Tali complessi sono costituiti da una subunità regolativa, denominata «ciclina», la cui funzione è quella di attivare, complessandosi con essa, la subunità enzimatica ad attività detta «CDK» (o chinasi-ciclina dipendente). Le CDK favoriscono la progressione del ciclo cellulare, attraverso le varie fasi G1, S, G2, M, mediante la fosforilazione di substrati proteici. In particolare, la loro attività si esplica mediante la fosforilazione di un residuo aminoacidico (serina o treonina) con conseguente attivazione della molecola bersaglio.

I numerosi complessi «chinasi-ciclina» che agiscono nelle varie fasi del ciclo cellulare sono:

- Cicline D1, D2 e D3 che, complessandosi con le chinasi CDK4 e CDK6, agiscono nella fase G1 precoce (fase di intervallo tra la fase M e la fase S);
- Ciclina E, che si complessa con la chinasi CDK2 ed agisce tra la fine della fase G1 e l'inizio della fase S;
- Ciclina A, che si complessa con la chinasi CDK2 ed agisce durante la fase S;
- Ciclina B, che si complessa con la chinasi CDK1 ed agisce durante la fase M.

A differenza delle CDK, presenti in livelli costanti durante tutte le fasi del ciclo, le cicline sono «ciclicamente» sintetizzate e degradate nel corso della divisione cellulare. Durante la parte iniziale della fase G1 (o fase G1 «precoce») i mitogeni (ormoni o fattori di crescita) attivano la sintesi delle cicline D che si complessano con le CDK4 o CDK6.

La ciclina E è espressa in fase G1 tardiva e forma complessi con CDK2. Questi due diversi complessi esplicano la loro attività enzimatica fosforilando un potente inibitore della crescita, la proteina onco-soppressore del retinoblastoma (pRb). La pRb nella sua forma ipofosforilata blocca la proliferazione sequestrando fattori di trascrizione di tipo E2F. I complessi D/CDK2 e E/CDK2 fosforilando pRb, eliminano l'azione inibente di pRb che rilascia il fattore trascrizionale E2F che, a sua volta, si complessa con i promotori specifici della fase S. In questo contesto possiamo dedurre che i regolatori positivi delle chinasi-ciclina-dipendenti (CDK), le cicline, si comportano da oncogeni (ciclina D1); al contrario, gli inibitori delle chinasi-ciclina-dipendenti (CDKi) si comportano da effettori negativi della proliferazione ed i geni che li codificano si identificano con i geni onco-soppressori. Tali inibitori si legano al complesso ciclina/CDK e inibendone l'attività bloccano la progressione del ciclo cellulare. Sono state identificate due famiglie di inibitori CDKi: la famiglia p21/CIP1, costituita da tre membri strutturalmente omologhi, p21, p27 e p57

che inibiscono in maniera non specifica i complessi C/CDK che si formano nella progressione del ciclo dalla fase G1 alla fase S, favorendo l'uscita dal ciclo cellulare e promuovendo la differenziazione; la seconda famiglia, denominata p16/INK4 è costituita da quattro membri, p15, p16, p18 e p19 considerati inibitori specifici dei complessi C/CDK4.

Le cicline D, codificate da oncogeni, gli inibitori delle chinasi-ciclina-dipendenti (p16, p21, p27) e altre proteine regolatorie della fase G1, codificate da geni onco-soppressori (p53, pRb, E2F), rivestono un importante ruolo nella progressione neoplastica; alterazioni strutturali a carico dei geni che codificano i loro prodotti proteici alterano l'equilibrio fisiologico tipico delle cellule normali caratterizzato da un «balance» tra regolatori positivi e negativi della proliferazione, determinandone una replicazione cellulare incontrollata.

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'apoptosi⁴⁶. 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 se-

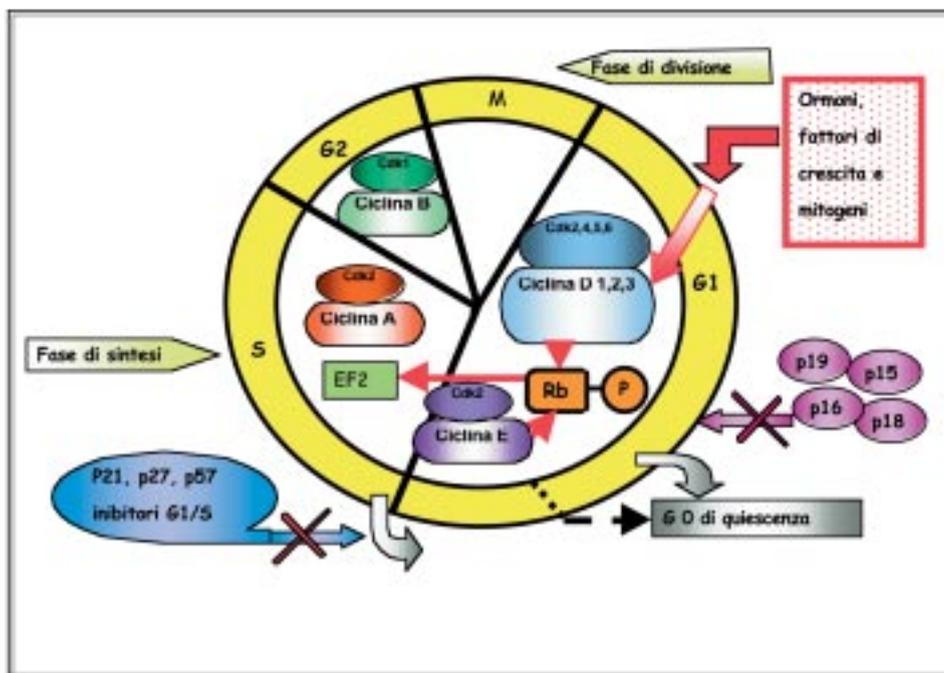


Fig. 3. Fasi del ciclo cellulare: promotori (Cicline, Cdk) e inibitori.

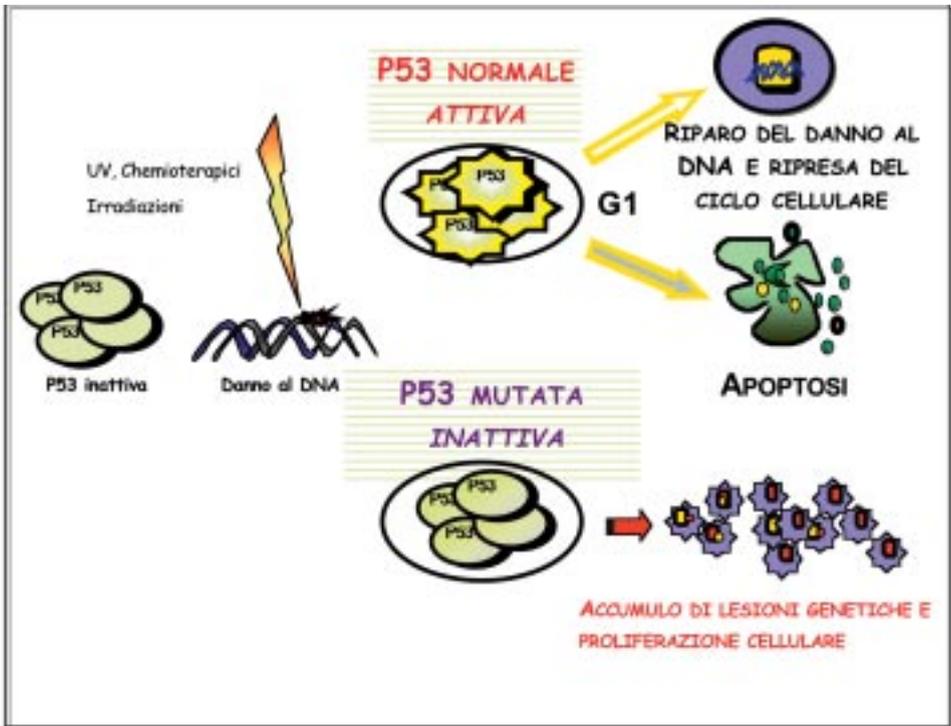


Fig. 4.
Risposta cellulare mediata da p53 a danno genotossico.

guito a 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)⁷¹, o verso un programma di morte geneticamente determinato, definito apoptosi (effetto ritardato)⁶⁶ (Fig. 4). 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, l'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 alterazioni 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 ²⁵, di bloccare la crescita di cellule trasformate ² e di eliminare il potenziale neoplastico in cellule in vitro ed in vivo ¹⁴.

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 ⁴⁵ e nel carcinoma della testa e del collo viene riportata un'incidenza tra il 10 ed il 75% dei casi ⁷ ⁵⁴. In particolare, le mutazioni occorrono tra gli esoni 4 e 9 anche se si riporta che specifiche mutazioni siano presenti maggiormente in alcune aree geografiche ⁴⁴ e che alcune siano anche specifiche per sedi ²².

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, sono mirate all'identificazione di un'eventuale sovraespressione della proteina nelle cellule tumorali, che si evidenzia per avere un'emivita più lunga rispetto a quelle normali.

Dalla letteratura emergono dati contrastanti sulle correlazioni tra espressione e mutazione: alcuni Autori riportano una stretta concordanza tra queste ¹¹ ⁴⁸, altri evidenziano l'incidenza di falsi negativi e positivi ⁴³ ⁵⁶.

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 di mutazioni 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, dev'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 ⁴⁴.

pRb. Il gene del retinoblastoma (Rb) è il primo gene onco-soppressore studiato e, per questo, rappresenta il prototipo di tutti i geni soppressori coinvolti nel processo di cancerogenesi. Codifica per una proteina del peso molecolare di 110 kdalton, che presenta modificazioni nel suo stato di fosforilazione durante il ciclo cellulare: la forma non fosforilata predomina in fase G1 e si ritiene inibisca la crescita cellulare, probabilmente legando fattori di trascrizione ⁹ ¹², mentre la forma fosfori-

lata, con azione opposta, permette la progressione del ciclo cellulare. Il gene che codifica la proteina Rb è localizzato sul cromosoma 13q. Anche se l'inattivazione del gene Rb sembra essere ristretta solo a pochi tumori (retinoblastomi, osteosarcomi ed altri), la sua espressione in molti tessuti implica la sua partecipazione al controllo della proliferazione in diversi tipi cellulari. La sua scoperta è conseguita allo studio di una neoplasia sostanzialmente rara, il retinoblastoma, presente in forma sporadica nel 60% dei casi ed in forma familiare nel restante 40%. Studiando proprio queste famiglie in cui l'incidenza di retinoblastoma era molto superiore rispetto alla popolazione generale, è stato osservato che lo sviluppo di questa neoplasia si verifica quando entrambi gli alleli del gene Rb, per mutazioni puntiformi o delezioni interessanti la regione 13q14, perdono la propria funzione. Nei casi familiari i bambini ereditano una copia difettosa del gene, ed il retinoblastoma si sviluppa quando, a causa di una mutazione somatica, anche l'altro allele viene alterato. In pratica la neoplasia si sviluppa quando la cellula retinica diviene omozigote per l'allele mutato. La sua funzione è quella di inibitore della crescita cellulare; la proteina Rb nella sua forma ipofosforilata blocca la proliferazione sequestrando fattori di trascrizione di tipo E2F. I complessi ciclina-chinasi ciclina-dipendenti, D/CDK2 e E/CDK2, agiscono sulla pRb fosforilandola ed eliminando così il rilascio del fattore trascrizionale E2F che, a sua volta va a complessarsi con i promotori specifici della fase S (Fig. 5).

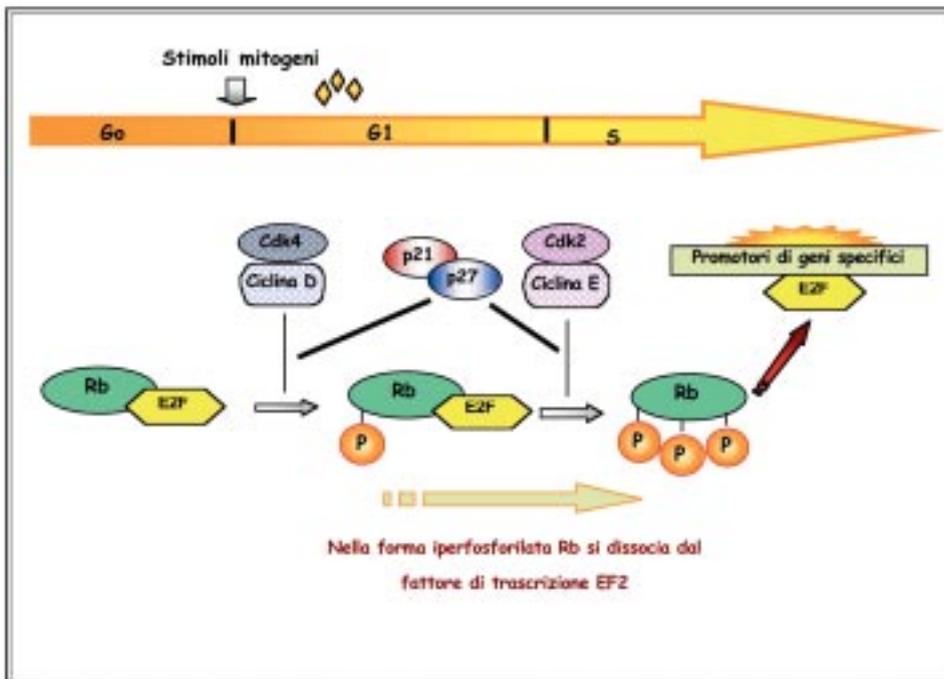


Fig. 5.
Regolazione di pRb durante le varie fasi del ciclo cellulare.

La fosforilazione di Rb durante il ciclo cellulare è quindi un punto di controllo che, avendo come esito la modulazione di geni che rispondono a E2F, permette la progressione del ciclo dalla fase G1 alla fase S. L'interazione tra Rb ed il fattore trascrizionale E2F può essere inibita anche da specifiche proteine oncovirali. L'assenza di Rb funzionale in seguito a mutazioni di tipo «recessivo» provocherebbe una costitutiva attivazione dei fattori di trascrizione ad esso legato, per la perdita della sua funzione frenante, con conseguente deregolazione del ciclo cellulare.

Ciclina D1. Il gene della ciclina D1 (gene *bcl-1*), identificato per la prima volta nel 1991 in linfomi B con traslocazione t(11-14), è localizzato a livello del braccio lungo del cromosoma 11 ed in particolare lungo il tratto 11q13 dove mappano diversi geni, tra cui i geni *int-2* e *hst-1*, che agiscono con meccanismo quantitativo ed iperespressione associate o meno ad amplificazione genica. Mentre *hst-1* e *int-1* codificano per i recettori di membrana per molecole tipo di fattore di crescita dei fibroblasti (FGF-R), *bcl-1* codifica per la ciclina D1. La ciclina D1 è una proteina che regola la progressione del ciclo cellulare a livello del check point G1/S e la sua sovraespressione sembra contribuire all'oncogenesi guidando le cellule nella transizione dalla fase G1 alla fase S⁶⁸. L'amplificazione genica e i riarrangiamenti cromosomici (inversioni e traslocazioni) sono i principali meccanismi in grado di provocare la sua iperespressione e di renderla costitutivamente attiva. Ricerche sperimentali riportano che la trasfezione di cellule normali con il gene della ciclina D1, insieme all'attivazione del gene *ras*, determina la trasformazione di cellule normali; inoltre, la sua sovraespressione influenzerebbe la crescita di cellule tumorali, riducendo la frazione di cellule che entrano in fase di quiescenza e predisponendole ad un aumento di possibili lesioni genetiche con conseguente effetto oncogenico.

p16. Il gene *p16/INK4* è localizzato sul cromosoma 9p21. Il prodotto genico è una proteina la cui funzione è quella di interagire con il complesso ciclina/CDK ed inibire l'attività delle chinasi ciclina-dipendenti CDK4 e CDK6; in questo senso può essere considerata un regolatore negativo del ciclo cellulare. La delezione del gene *p16* su entrambi gli alleli (di tipo «recessivo») è l'evento più frequentemente descritto in diversi tipi di tumore tra cui i carcinomi della testa e del collo⁶³; tuttavia, mutazioni puntiformi di questo gene, che inattivano la funzione della proteina codificata, sono comuni anche in altri tipi di neoplasie quali, melanomi familiari e carcinomi esofagei⁶¹. Nei carcinomi squamosi della testa e del collo la perdita della funzione del gene che codifica la proteina *p16* sembra essere un «evento precoce» nella progressione neoplastica; infatti, la perdita di geni situati sul locus 9p21 è stata riscontrata già nelle lesioni preneoplastiche.

p21 e p27. Recenti studi hanno dimostrato che le cicline ed i complessi ciclina-chinasi dipendenti (CDK) svolgono un importante ruolo durante la progressione del ciclo cellulare. I complessi CDK sono regolati dalle CDKIs che generalmente inibiscono la progressione del ciclo cellulare e che comprendono diverse e molteplici proteine sostanzialmente appartenenti a due famiglie per la loro differente struttura e funzione. Tra queste si comprendono *p21/WAF1/CIP1* (*p21*) e *p27/Kip1* che insieme a *p57/Kip2* (*p57*) agiscono quando sovraesprese come inibitori nei processi di regolazione del ciclo cellulare agendo sui complessi ciclina/kinasi dipendenti. Il

passaggio dalla fase G1 alla fase S è regolato sostanzialmente da due sistemi: il primo mediato da pRb che inibisce la progressione attraverso il legame di trascrizione E2F, che risulta così inattivato ed incapace pertanto di inviare segnali di trasduzione per i geni necessari alla progressione; il secondo controllato da p21, p27 e p57 che agiscono inibendo l'attività della chinasi ciclina dipendenti (complesso ciclina/cdk). In particolare nelle cellule le proteine p21 e p27 sembrano agire attraverso un'azione di inibizione del complesso ciclina E/cdk che contribuisce all'arresto della progressione cellulare: la prima (p21), che viene regolata trascrizionalmente dall'oncosoppressore p53, per un suo aumento come conseguenza di un aumento di p53 in risposta ad un danno del DNA, la seconda (p27), grazie all'azione del TGF-beta, che sposta la p27 dal legame con la ciclina D7 rendendola disponibile per l'unione con i complessi delle cicline E (ciclina E/cdk2) e della ciclina A (ciclina A/cdk2) che vengono così inattivati e non producendo la fosforilazione di pRb prevengono la progressione cellulare.

Riguardo la proteina p27, molteplici lavori le hanno attribuito, accanto alla universale riconosciuta azione inibitoria sul ciclo cellulare, diverse funzioni tra cui quella di essere un potenziale gene soppressore^{13 55}, un promotore di apoptosi⁴¹, un regolatore nei tumori solidi della resistenza farmacologica ed infine quello di essere coinvolto nei processi infiammatori⁵⁹.

Per quanto concerne la proteina p21, numerosi lavori sperimentali dimostrano che è coinvolta nei meccanismi di regolazione della proliferazione cellulare; la sua presenza è stata, infatti, riscontrata in vitro, sia in cellule normali sia trasformate⁷⁵. Alcuni autori mettono in risalto una sua distribuzione topografica in differenti tessuti, tra cui anche aree di epitelio squamoso dell'esofago, compatibile con una stato di arresto della proliferazione²¹. Deve essere sottolineato però che, nonostante sia stato dimostrato che il suo livello nelle neoplasie umane possa variare, a causa di una regolazione post-trascrizionale, un suo preciso ruolo nel controllo della proliferazione cellulare non è ancora completamente chiaro in quanto ci sono evidenze che altri meccanismi, oltre quelli mediati da p53, possano influenzarlo^{53 77}.

La perdita della funzione di p21 è stata associata ad una cattiva prognosi e riscontrata in diverse neoplasie quali carcinomi del polmone, della mammella, della prostata e gastrici^{3 26 42 49}.

Apoptosi: geni che controllano il processo di morte cellulare programmata

È ormai ben stabilito che la morte cellulare può essere determinata da due processi primari ben distinti: la necrosi e l'apoptosi.

La «necrosi» generalmente è un processo di morte cellulare che si avvera in seguito a danni cellulari acuti come l'ipossia, l'ipertermia, l'aggressione da parte di agenti infettivi, l'esposizione a tossine esogene o endogene o l'attacco del complemento. Le proteasi intracellulari attivate determinano dapprima un danno mitocondriale, quindi interviene una grave disfunzione della membrana cellulare con perdita dell'omeostasi cellulare, rigonfiamento e lisi della cellula. La lisi è seguita dal rilascio di enzimi lisosomiali che determinano un processo infiammatorio perinecrotico.

L'«apoptosi» è invece un processo fisiologico che interviene durante lo sviluppo embrionale, nel rimodellamento e nella riparazione dei tessuti contribuendo all'omeostasi tissutale. Le cellule danneggiate, atipiche o giunte al termine del loro ci-

clo vitale, vengono eliminate attraverso questo processo attivo di morte cellulare geneticamente determinato. Il processo apoptotico è distinto da quello necrotico anche dal punto di vista morfologico: le cellule che muoiono per apoptosi vanno incontro a fenomeni di gemmazione con formazione di corpi apoptotici costituiti da frammenti nucleari, senza l'instaurarsi di fenomeni infiammatori.

L'apoptosi è coinvolta anche nell'insorgenza di tumori. Il primo passo verso la trasformazione neoplastica è, infatti, un danno al DNA di una cellula, che la porta a perdere il controllo della sua capacità proliferativa. In condizioni normali la cellula o ripara il danno o si «suicida» cioè va incontro a morte per apoptosi. Alterazioni nei geni che controllano questo tipo di morte, rendono la cellula resistente all'apoptosi ed il conseguente accumulo di cellule cancerose incapaci di morire gioca un ruolo essenziale nella progressione neoplastica. La connessione tra apoptosi e cancro è diventata ancora più evidente allorché si sono scoperti i precisi meccanismi genetici che sono alla base del fenomeno. Infatti, come per molti fenomeni biologici fondamentali per il mantenimento dell'omeostasi cellulare, l'apoptosi è regolata da proto-oncogeni e geni onco-soppressori. Pertanto l'inattivazione o la mutazione di geni coinvolti nella regolazione di questo fenomeno possono partecipare allo sviluppo del processo neoplastico.

Dal punto di vista molecolare si possono distinguere essenzialmente tre compartimenti genici implicati nel processo di morte cellulare programmata le cui diverse funzioni sono schematizzate in Figura 6.

– Compartimento iniziatore: che raccoglie lo stimolo e lo converte in segnale. Il fenomeno di morte per apoptosi può essere indotto da cause intracellulari, quali un danno al DNA (con conseguente aumento di p53) o da cause extracellulari, come la mancata stimolazione da parte di fattori di crescita o l'azione di citochine modulari extracellulari dell'apoptosi (TNF- α , FasL, TRAIL) che interagiscono con i rispettivi recettori (TNF-R, Fas, DR3, DR4, DR5).

– Compartimento modulatore: che integra i segnali ricevuti dal compartimento iniziatore valutando il livello di espressione di geni pro o anti-apoptotici presenti nella cellula al momento dello stimolo. Appartengono a questo compartimento c-Myc e la famiglia Bcl-2, oncogeni modulatori della suscettibilità delle cellule alla morte o soglia apoptotica.

– Compartimento esecutore: preposto alla trasduzione dei segnali ricevuti in eventi biochimici della morte programmata. Comprende i geni che codificano le «caspasi», enzimi proteolitici presenti nel citoplasma in forma di precursori inattivi.

Due vie principali sono coinvolte nel meccanismo apoptotico: una comprende l'attivazione diretta delle proteasi e l'altra, regolata dalle proteine della famiglia Bcl-2, interessa i mitocondri. Le due vie, attraverso il compartimento modulatore, sono profondamente correlate tra loro e, interagendo, permettono una notevole amplificazione dei segnali intra- ed extra-cellulari.

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. Il ruolo del gene onco-soppressore p53 nelle neoplasie umane è stato ampiamente descritto nei paragrafi precedenti.

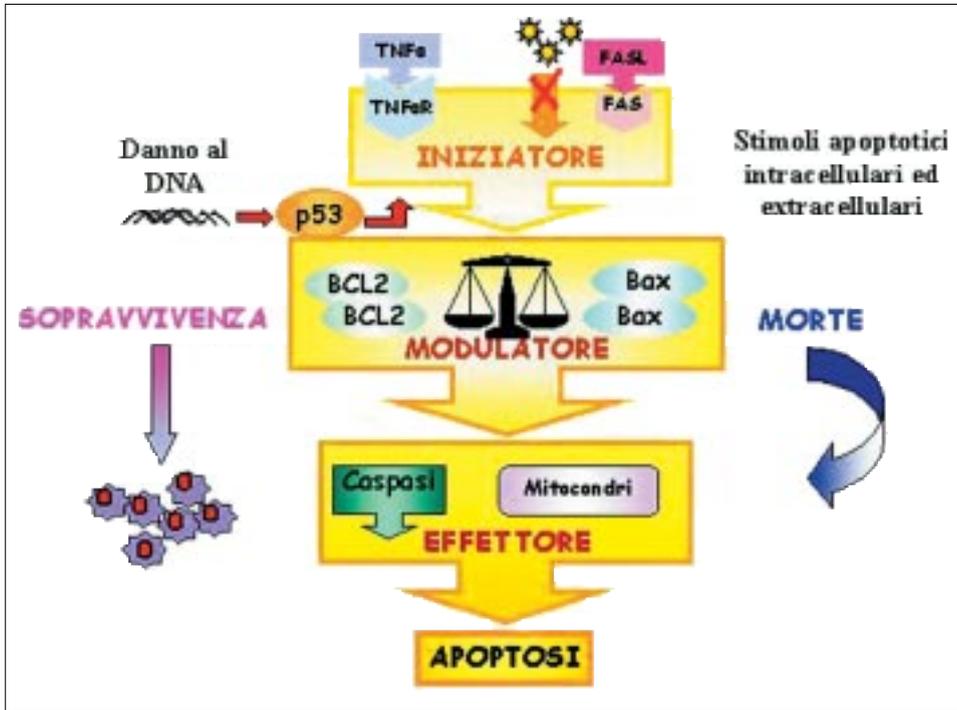


Fig. 6. Apoptosi: compartimenti genici implicati nel processo di morte cellulare programmata.

Bcl-2. Bcl-2 è il capostipite di una famiglia di geni che include membri sia ad attività anti-apoptotica (Bcl-2, Bcl-Xl e Bcl-W) che pro-apoptotica (Bax, Bak, Bcl-Xs e Bad).

Le proteine di questa famiglia sono localizzate sulla membrana nucleare, mitocondriale esterna e su quelle del reticolo endoplasmatico. In risposta a segnali extracellulari di morte, le proteine pro-apoptotiche vengono traslocate sulla membrana mitocondriale dove ne alterano la permeabilità, formando canali o alterando quelli già esistenti. La modificazione del potenziale di membrana determina il rilascio del citocromo-c e la produzione di radicali liberi dell'O₂. L'effetto inibente o favorente la morte per apoptosi dipende dalla dimerizzazione delle proteine della famiglia Bcl-2. Infatti, Bcl-2 si lega ad altri membri della sua famiglia per formare omodimeri o eterodimeri (Bcl-2-Bcl-2 o Bcl-2-Bax), il cui significato cellulare varia da pro-apoptotico (quando si complessa con membri ad attività pro-apoptotica) ad anti-apoptotico (quando si complessa con membri ad attività anti-apoptotica). La sensibilità o la resistenza della cellula alla morte dipende dal rapporto relativo tra i vari membri: se all'interno della cellula i geni pro-apoptotici sono in maggioranza, allora si formano dimeri che indurranno la morte cellulare per apoptosi, al contrario in caso di prevalenza di membri anti-apoptotici, verrà favorita la sopravvivenza cel-

lulare. Di particolare importanza è la valutazione del rapporto Bcl-2/Bax⁵⁸. Di fatto, tra i diversi geni coinvolti nei meccanismi di apoptosi, Bcl-2 sarebbe la proteina «chiave», in grado di modulare in modo fine la risposta apoptotica. Alcune evidenze in letteratura, riportano una mutazione del gene Bcl-2 che favorirebbe l'omodimerizzazione Bcl-2-Bcl-2. Inoltre, l'elevata espressione di Bcl-2, alterazione genica assai frequente in molti tipi di tumore, sarebbe correlata con un potenziale di sopravvivenza elevato in grado di rendere le cellule tumorali più resistenti al trattamento con chemioterapici.

TELOMERASI

La telomerasi è un enzima nucleare la cui funzione è quella di mantenere l'integrità delle porzioni terminali dei cromosomi, i telomeri, durante la duplicazione cellulare. Strutturalmente la telomerasi è un complesso nucleoproteico costituito da una componente a RNA (indicata come hTR, RNA telomerasi umana), che funziona da stampo e da una componente multiproteica (hTRT, trascrittasi inversa della telomerasi umana), che funziona nell'insieme come un enzima con attività di retrotrascrittasi (enzima che trascrive una catena di DNA su uno stampo a RNA), capace di aggiungere nuove sequenze telomeriche all'estremità cromosomiali. I telomeri sono strutture specializzate, costituite da brevi sequenze ripetitive nucleotidiche, situate all'estremità dei cromosomi^{4 28} (Fig. 6). Essi funzionano come dei «cappucci» protettivi che stabilizzano il cromosoma durante la duplicazione cellulare e lo proteggono da eventuali rotture casuali ad opera di nucleasi cellulari. Durante il ciclo di duplicazione delle cellule, i telomeri vanno normalmente incontro ad un progressivo accorciamento, fino a raggiungere una lunghezza critica che costituisce un segnale di blocco per la replicazione cellulare e segna l'inizio del programma di senescenza.

È, infatti, ormai noto che la maggior parte delle cellule, con alcune eccezioni, hanno un potenziale proliferativo limitato e dopo un certo numero di divisioni (ca. 50) cessano di dividersi e vanno incontro all'invecchiamento (Fig. 7). Poiché ad ogni ciclo di divisione si accorciano, i telomeri si comportano come un «orologio cellulare» che segna il tempo di vita delle cellule, svolgendo un importante ruolo nel controllo biologico del potenziale replicativo delle cellule^{15 52 62}.

Mentre nelle cellule embrionali ed in quelle germinali maschili è rilevabile un'attività telomerasica elevata, ciò non è evidente nelle cellule somatiche adulte. In queste cellule l'espressione della telomerasi è finemente controllata, essendo inattiva, o comunque presente in quantità insufficienti a prevenire il progressivo accorciamento dei cromosomi¹⁵. Fanno tuttavia eccezione le cellule proliferative di alcuni tessuti, come le cellule basali dell'epidermide, quelle delle cripte intestinali ed i linfociti attivati^{51 57}. Al contrario di quello che accade nelle cellule adulte, più dell'85% delle cellule cancerose esprimono alti livelli di attività telomerasica. Infatti, la sua riattivazione, fuori tempo e fuori luogo, ha come risultato quello di assicurare un'illimitata capacità proliferativa alle cellule ai fini dell'espansione tumorale^{29 37 67}. Tali evidenze sono state documentate da esperimenti in vitro^{6 30 34} ed osservazioni in vivo⁵⁸.

Non è ancora chiaro quale sia il meccanismo di attivazione della telomerasi nel-

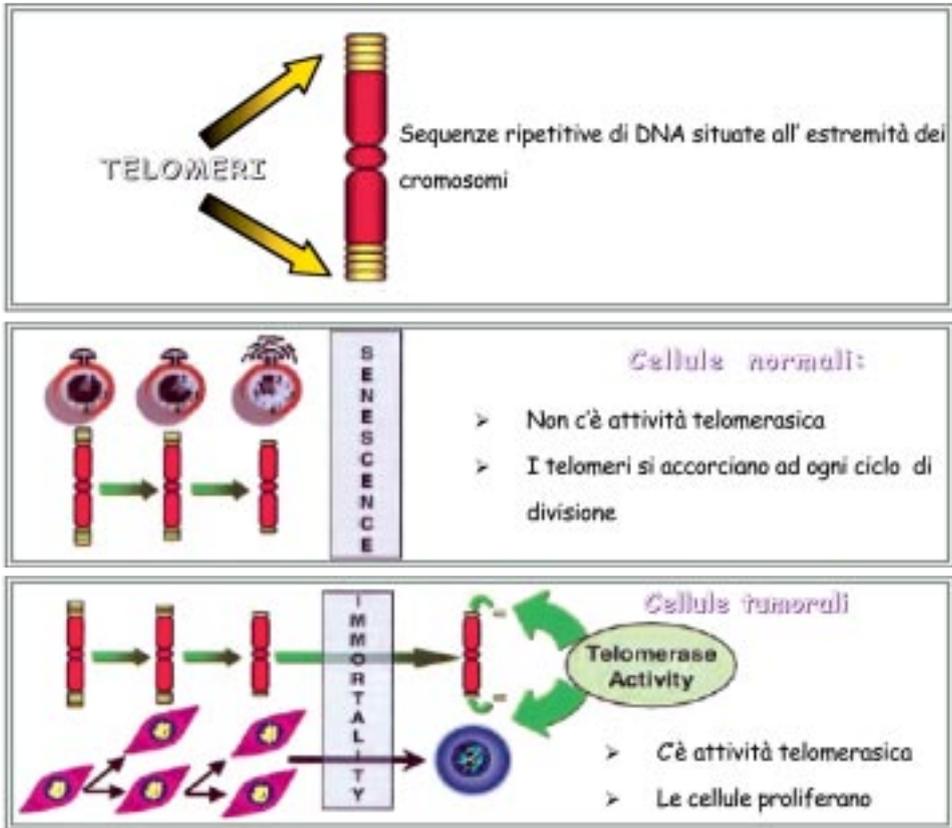


Fig. 7.

Ciclo di regolazione della lunghezza dei telomeri, da parte dell'enzima telomerasi, rispettivamente nelle cellule normali ed in quelle neoplastiche.

Fonte: Nicol Keith W, Jeffrey Evans TR, Rosalind, Glasspool M. *Telomerase and cancer: time to move from a promising target to a clinical reality.* J Pathol Rev Article J Pathol 2001;195:404-14.

le cellule cancerose. Si suppone che mutazioni o riarrangiamenti cromosomici o, una selezione positiva di quei cloni in cui la telomerasi è già attiva, potrebbero conferire un vantaggio selettivo alla crescita tumorale. Inoltre non è ancora noto in quale «step» del processo di cancerogenesi avvengano tali alterazioni ma, il riscontro di una maggiore attività telomerasica nella mucosa circostante il tumore, ed in particolare a livello di lesioni displastiche, sarebbe a favore dell'ipotesi che la sua attivazione possa rappresentare un evento precoce nel processo di trasformazione neoplastica.

L'aumento di espressione del 80-90% dell'attività telomerasica è stato riscontrato in un ampio spettro di tumori umani^{1 31 57} tra cui anche i carcinomi della testa e del collo^{18 36 50 64}. Tuttavia, nonostante queste incoraggianti evidenze, deve essere indicato come vi sono ancora numerosi problemi da affrontare relativi alla specifi-

cità e sensibilità dei metodi utilizzati per la rilevazione dell'attività telomerasica. La maggior parte delle determinazioni dell'attività telomerasica sono state condotte, su estratti di tessuti eterogenei, grazie alla messa a punto di un saggio di amplificazione delle sequenze ripetute della telomerasi (PCR-TRAP assay). Pur trattandosi di una metodica accurata e sensibile, la sua corretta determinazione non è sempre facile in quanto occorre tenere presente che quest'enzima è espresso anche in cellule dotate di un elevato potenziale proliferativo di vari tessuti epiteliali ed in linfociti attivati che potrebbero infiltrare il tessuto. Inoltre, l'attività telomerasica potrebbe essere inattivata da inibitori presenti negli estratti tissutali. Tali fattori metodologici possono influenzare la specificità del metodo. Probabilmente sarebbe opportuno convalidare questi risultati con tecniche immunostochimiche che permettono di rilevare la presenza dell'enzima e di individuarne l'esatta localizzazione nel tessuto³²

35 70 76

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Albanell J, Bosl GJ, Reuter VE, Engelhardt M, Franco S, Moore MA, et al. *Telomerase activity in germ cell cancers and mature teratomas*. J Natl Cancer Inst 1999;91:1321-6.
- ² Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. *Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53*. Science 1990;249:912-15.
- ³ Barbareschi M, Caffo O, Doglioni C, Fina P, Marchetti A, Buttitta F, et al. *p21WAF1 immunohistochemical expression in breast carcinoma: correlations with clinicopathological data, oestrogen receptor status, MIB1 expression, p53 gene and protein alterations and relapse-free survival*. Br J Cancer 1996;74:208-15.
- ⁴ Blackburn EH. *Structure and function of telomeres*. Nature 1991;350:569-73. Review.
- ⁵ Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, et al. *Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA*. Cell 1997;91:25-34.
- ⁶ Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, et al. *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells*. Science 1998;279:349-52.
- ⁷ Brachman DG, Graves D, Vokes E, Beckett M, 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.
- ⁸ Broccoli D, Godley LA, Donehower LA, Varmus HE, de Lange T. *Telomerase activation in mouse mammary tumors: lack of detectable telomere shortening and evidence for regulation of telomerase RNA with cell proliferation*. Mol Cell Biol 1996;16:3765-72.
- ⁹ Buchkovich K, Duffy LA, Harlow E. *The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle*. Cell 1989;58:1097-105.
- ¹⁰ 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.
- ¹¹ Calzolari A, Chiarelli I, Bianchi S, Messerini L, Gallo O, Porfirio B, et al. *Immunohistochemical vs molecular biology methods. Complementary techniques for effective screening of p53 alterations in head and neck cancer*. Am J Clin Pathol 1997;107:7-11.
- ¹² Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. *The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein*. Cell 1991;65:1053-61.
- ¹³ Chen J, Willingham T, Shuford M, Nisen PD. *Tumor suppression and inhibition of aneuploid cell accumulation in human brain tumor cells by ectopic overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27KIP1*. J Clin Invest 1996;97:1983-8.
- ¹⁴ Chen PL, Chen YM, Bookstein R, Lee WH. *Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene*. Science 1990;250:1576-80.
- ¹⁵ Choi D, Whittier PS, Oshima J, Funk WD. *Telomerase expression prevents replicative senescence*

- but does not fully reset mRNA expression patterns in Werner syndrome cell strains. *FASEB J* 2001;15:1014-20.
- 16 Cortesina G, Martone T, Galeazzi E, Olivero M, De Stefani A, Bussi M, et al. Staging of head and neck squamous cell carcinoma using the MET oncogene product as marker of tumor cells in lymph node metastases. *Int J Cancer* 2000;89:286-92.
- 17 Craven JM, Pavelic ZP, Stambrook PJ, Pavelic L, Gapany M, Kelley DJ, et al. Expression of *c-erbB-2* gene in human head and neck carcinoma. *Anticancer Res* 1992;12:2273-6.
- 18 Curran AJ, Gullane PJ, Irish J, Macmillan C, Freeman J, Kamel-Reid S. Telomerase activity is upregulated in laryngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2000;110:391-6.
- 19 Di Renzo MF, Olivero M, Giacomini A, Porte H, Chastre E, Mirossay L, et al. Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1995;1:147-54.
- 20 Di Renzo MF, Poulosom R, Olivero M, Comoglio PM, Lemoine NR. Expression of the Met/hepatocyte growth factor receptor in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1995;55:1129-38.
- 21 el-Deiry WS, Tokino T, Waldman T, Oliner JD, Velculescu VE, Burrell M, et al. Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1995;55:2910-9.
- 22 el-Naggar AK, Lai S, Luna MA, Zhou XD, Weber RS, Goepfert H, et al. Sequential p53 mutation analysis of pre-invasive and invasive head and neck squamous carcinoma. *Int J Cancer* 1995;64:196-201.
- 23 Field JK, Spandidos DA, Yiagnis M, Gosney JR, Papadimitriou K, Stell PM. *C-erbB-2* expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res* 1992;12:613-9.
- 24 Filmus J, Pollak MN, Cailleau R, Buick RN. MDA-468, a human breast cancer cell line with a high number of epidermal growth factor (EGF) receptors, has an amplified EGF receptor gene and is growth inhibited by EGF. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;128:898-905.
- 25 Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989;57:1083-93.
- 26 Gomyo Y, Ikeda M, Osaki M, Tatebe S, Tsujitani S, Ikeguchi M, et al. Expression of p21 (*waf1/cip1/sdi1*) but not p53 protein, is a factor in the survival of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer* 1997;79:2067-72.
- 27 Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 1993;53:3579-84.
- 28 Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 1989;337:331-7.
- 29 Hahn WC, Meyerson M. Telomerase activation, cellular immortalization and cancer. *Ann Med* 2001;33:123-9. Review.
- 30 Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, et al. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med* 1999;5:1164-70.
- 31 Harle-Bachor C, Boukamp P. Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6476-81.
- 32 Heine B, Hummel M, Demel G, Stein H. Demonstration of constant upregulation of the telomerase RNA component in human gastric carcinomas using in situ hybridization. *J Pathol* 1998;185:139-44.
- 33 Hendler FJ, Ozanne BW. Human squamous cell lung cancers express increased epidermal growth factor receptors. *J Clin Invest* 1984;74:647-51.
- 34 Herbert B, Pitts AE, Baker SI, Hamilton SE, Wright WE, Shay JW, et al. Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:14276-81.
- 35 Hiyama T, Yokozaki H, Kitadai Y, Haruma K, Yasui W, Kajiyama G, et al. Overexpression of human telomerase RNA is an early event in oesophageal carcinogenesis. *Virchows Arch* 1999;434:483-7.
- 36 Hohaus S, Cavallo S, Bellacosa A, Genuardi M, Galli J, Cadoni G, et al. Telomerase activity in human laryngeal squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 1996;2:1895-900.
- 37 Holt SE, Shay JW. Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. *J Cell Physiol*

- 1999;180:10-8. Review.
- 38 Humphrey PA, Zhu X, Zarnegar R, Swanson PE, Ratliff TL, Vollmer RT, et al. *Hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) in prostatic carcinoma*. Am J Pathol 1995;147:386-96.
- 39 Issing WJ, Wustrow TP, Heptt WJ. *Oncogenes related to head and neck cancer*. Anticancer Res 1993;13:2541-51. Review.
- 40 Jeffers M, Schmidt L, Nakaigawa N, Webb CP, Weirich G, Kishida T, et al. *Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer*. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:11445-50.
- 41 Katayose Y, Kim M, Rakkar ANS, et al. *Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27*. Cancer Res 1997;57:5441-5.
- 42 Komiya T, Hosono Y, Hirashima T, Masuda N, Yasumitsu T, Nakagawa K, et al. *p21 expression as a predictor for favorable prognosis in squamous cell carcinoma of the lung*. Clin Cancer Res 1997;3:1831-5.
- 43 Kropveld A, Slootweg PJ, van Mansfeld AD, Blankenstein MA, Hordijk GJ. *Radioresistenzce and p53 status of T2 laryngeal carcinoma. Analysis by immunohistochemistry and denaturing gradient gel electrophoresis*. Cancer 1996;78:991-7.
- 44 Lavert P, Adelstein DJ, Myles J, Secic M. *P53 and Ki-67 as outcome predictors for advanced squamous cell cancers of the head and neck treated with chemoradiotherapy*. Laryngoscope 2001;111:1878-92.
- 45 Levine AJ. *p53, the cellular gatekeeper for growth and division*. Cell 1997;88:323-31. Review.
- 46 Levine AJ, Momand J, Finlay CA. *The p53 tumour suppressor gene*. Nature 1991;351:453-6. Review.
- 47 Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H, et al. *Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin*. Nature 1985;313:144-7.
- 48 Maestro R, Dolcetti R, Gasparotto D, Doglioni C, Pelucchi S, Barzan L, et al. *High frequency of p53 gene alterations associated with protein overexpression in human squamous cell carcinoma of the larynx*. Oncogene 1992;7:1159-66.
- 49 Matsushima H, Sasaki T, Goto T, Hosaka Y, Homma Y, Kitamura T, et al. *Immunohistochemical study of p21WAF1 and p53 proteins in prostatic cancer and their prognostic significance*. Hum Pathol 1998;29:778-83.
- 50 Maurizi M, Almadori G, Cadoni G, Hohaus S, Cavallo S, Genuardi M, et al. *Telomerase activity in human laryngeal squamous cell carcinomas*. In: Mc Cafferthy G, Coman W, Carrol eds. XVI World Congress ORL Head and Neck surgery. Monduzzi Editore 1997:569-73.
- 51 Meeker AK, Coffey DS. *Telomerase: a promising marker of biological immortality of germ, stem, and cancer cells*. A review. Biochemistry (Mosc). 1997;62:1323-31. Review.
- 52 Meyerson M. *Role of telomerase in normal and cancer cells*. J Clin Oncol 2000;18:2626-34. Review.
- 53 Michieli P, Chedid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE, Givol D. *Induction of WAF1/CIP1 by a p53 independent pathway*. Cancer Res 1994;54:3391-5.
- 54 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.
- 55 Niyokawa H, Kineman RD, Manova-Todorova KO, Soares VC, Hoffman ES, Ono M, et al. *Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27 Kip1*. Cell 1996;85:721-32.
- 56 Nylander K, Nilsson P, Mehle C, Roos G. *p53 mutations, protein expression and cell proliferation in squamous cell carcinomas of the head and neck*. Br J Cancer 1995;71:826-30.
- 57 Ogoshi M, Le T, Shay JW, Taylor RS. *In situ hybridization analysis of the expression of human telomerase RNA in normal and pathologic conditions of the skin*. J Invest Dermatol 1998;110:818-23.
- 58 Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death*. Cell 1993;74:609-19.
- 59 Ophascharoensuk V, Fero ML, Hughes J, Roberts JM, Shankland SJ. *The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 safeguards against inflammatory injury*. Nat Med 1998;4:575-80.
- 60 Ozanne B, Richards CS, Hendler F, Burns D, Gusterson B. *Over-expression of the EGF receptor is a hallmark of squamous cell carcinomas*. J Pathol 1986;149:9-14.

- ⁶¹ Pollock PM, Pearson JV, Hayward NK. *Compilation of somatic mutations of the CDKN2 gene in human cancers: non-random distribution of base substitutions*. Genes Chromosomes Cancer 1996;15:77-88. Review.
- ⁶² Reddel RR. *The role of senescence and immortalization in carcinogenesis*. Carcinogenesis 2000;21:477-84. Review.
- ⁶³ Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, et al. *High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer Res 1996;56:3630-3.
- ⁶⁴ Ries JC, Hassfurth E, Steininger H, Kloss FR, Wiltfang J, Girod SC, et al. *Correlation of telomerase activity, clinical prognosis and therapy in oral carcinogenesis*. Anticancer Res 2001;21:1057-63.
- ⁶⁵ Rong S, Jeffers M, Resau JH, Tsarfaty I, Oskarsson M, Vande Woude GF. *Met expression and sarcoma tumorigenicity*. Cancer Res 1993;53:5355-60.
- ⁶⁶ 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.
- ⁶⁷ Shay JW, Bacchetti S. *A survey of telomerase activity in human cancer*. Eur J Cancer 1997;33:787-91. Review.
- ⁶⁸ Sherr CJ. *Cancer cell cycles*. Science 1996;274:1672-7. Review.
- ⁶⁹ Shin DM, Ro JY, Hong WK, Hittelman WN. *Dysregulation of epidermal growth factor receptor expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis*. Cancer Res 1994;54:3153-9.
- ⁷⁰ Soder AI, Going JJ, Kaye SB, Keith WN. *Tumour specific regulation of telomerase RNA gene expression visualized by in situ hybridization*. Oncogene 1998;16:979-83.
- ⁷¹ Spandidos DA, Lamothe A, Field JK. *Multiple transcriptional activation of cellular oncogenes in human head and neck solid tumours*. Anticancer Res 1985;5:221-4.
- ⁷² Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J. *Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility*. Nature 1987;327:239-42.
- ⁷³ Vogelstein B, Kinzler KW. *The multistep nature of cancer*. Trends Genet 1993;9:138-41. Review.
- ⁷⁴ Voravud N, Shin DM, Ro JY, Lee JS, Hong WK, Hittelman WN. *Increased polysomies of chromosomes 7 and 17 during head and neck multistage tumorigenesis*. Cancer Res 1993;53:2874-83.
- ⁷⁵ Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. *p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases*. Nature 1993;366:701-4.
- ⁷⁶ Yashima K, Maitra A, Rogers BB, Timmons CF, Rathi A, Pinar H, et al. *Expression of the RNA component of telomerase during human development and differentiation*. Cell Growth Differ 1998;9:805-13.
- ⁷⁷ Zeng YX, el-Deiry WS. *Regulation of p21WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways*. Oncogene 1996;12:1557-64.

V. INDICI BIOLOGICI DI AGGRESSIVITÀ

V.1. FATTORI ANGIOGENETICI

L. Pignataro*, T. Martone, F. Beatrice**, R. Albera, F. Palonta, G. Cortesina

Il termine angiogenesi indica un processo di generazione di nuovi vasi sanguigni che conduce, in ultima analisi, ad una neovascolarizzazione⁷. Se, in condizioni fisiologiche, la neoformazione di vasi sanguigni che si riscontra durante la morfogenesi, la riproduzione e la riparazione tissutale è caratterizzata da una durata limitata nel tempo grazie al bilanciamento tra fattori angiogenetici ed angiostatici, in condizioni patologiche essa si differenzia per un indefinito mantenimento¹⁶. Il concetto che la crescita tumorale è dipendente dall'angiogenesi è stato proposto per la prima volta da Folkman⁷ nel 1971 ed in seguito sostenuto da diverse osservazioni sperimentali^{12 17 20}. Negli stadi iniziali (fase prevascolare) il tumore solido si alimenta per diffusione di sostanze nutrienti dai capillari dell'ospite, in seguito, per le aumentate intrinseche esigenze metaboliche, necessita di una maggiore vascolarizzazione tanto che secerne direttamente (secrezione autocrina) o indirettamente, tramite la stimolazione di cellule vicine (secrezione paracrina), fattori angiogenetici (fase vascolare)^{7 19 27 29} (Fig. 1). Alla luce di queste considerazioni emerge come la progressione del tumore, entro certi limiti, richiede il reclutamento di nuovi vasi sanguigni dell'ospite circostanti al tumore e la stimolazione di polipeptidi funzionanti come fattori di crescita autocrini e paracrini.

Ricerche sperimentali suggeriscono che l'angiogenesi regola il rimodellamento della matrice extracellulare, la proliferazione delle cellule endoteliali, la differenziazione dei capillari e lo stabilirsi delle anastomosi indispensabili per garantire l'apporto sanguigno³.

Dalla letteratura si evince come questo processo sia normalmente controllato dall'azione di tipo «balance» tra fattori pro- ed anti- angiogenetici capaci di indurre o limitare la proliferazione endoteliale e la conseguente formazione di neovasi²⁶ che possono a loro volta essere inibiti o attivati da differenti stimoli quali, ad esempio, fattori ormonali od ipo-ossigenazione. Tra gli agenti attivatori si annoverano il VEGF (vascular endothelial growth factor)³³, l'angiotropina, i fattori di crescita, acido e basico, dei fibroblasti (a-FGF e b-FGF), il TGF- α e TGF- β (transforming growth factor- alpha e beta), il TNF- α e TNF β (tumor necrosis factor-alpha e beta) ed il PD-ECGF (Platelet- derived endothelial cell growth factor)^{3 10 21 30}. Tra i prin-

II Clinica ORL, Università di Torino;

* I Clinica ORL, Ospedale Maggiore Policlinico IRCCs, Università di Milano;

** Divisione ORL, A.S.O. «S. Giovanni Bosco» di Torino

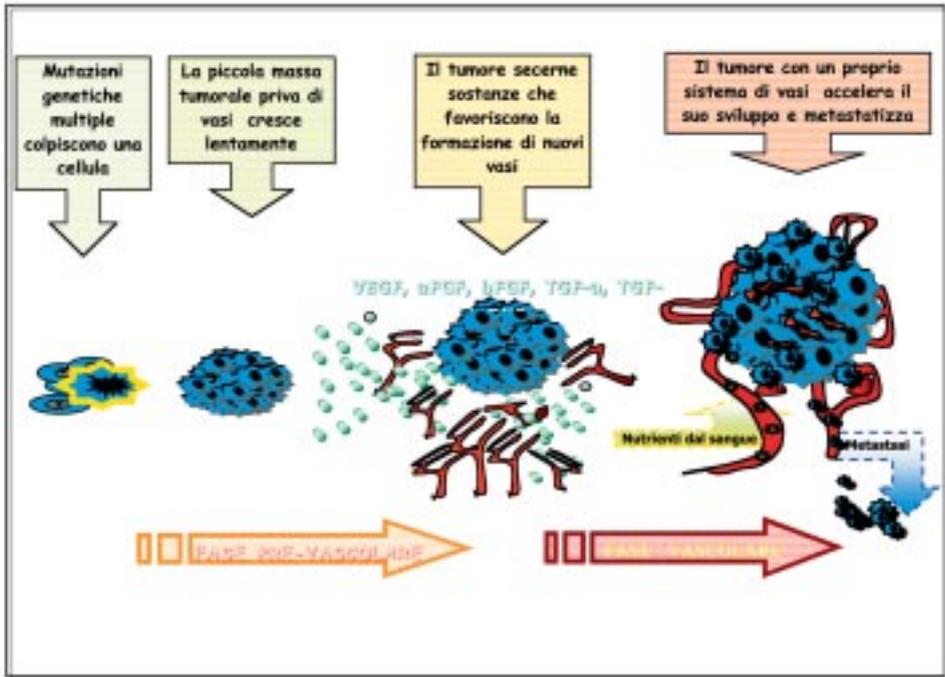


Fig. 1.

Schema del processo di angiogenesi tumorale proposto da Folkman^{7,8}.

cipali inibitori si annoverano la trombospodina 1 o TSP-1, primo fattore il cui livello è stato dimostrato in vivo essere inversamente proporzionale alla neoformazione di vasi tumorali^{15,31}, l'angiostatina ed altri fattori quali la protamina, il fattore piastrinico 4, gli steroidi angiostatici (11- α epiidrocortisone e tetraidrocortisolo), analoghi dell'eparina (2-idrossi, 5-nitrocatoluene-sulfonato sodico [HNT], peptidoglicano-polisaccaride sulfonato, ciclodestrine sulfonate), della prolina, la D-penicillamina, l'interferone e la fumagallina. Le modalità di azione di molte di queste molecole sono tutt'oggi ancora parzialmente sconosciute. In generale, sono stati proposti tre meccanismi di inibizione dell'angiogenesi: il primo, definito «tumor-directed», esplica la sua funzione direttamente sulle cellule tumorali prevenendo il rilascio o la sintesi di molecole angiogeniche; il secondo, detto «factor-directed», disattiva i fattori angiogenetici, già rilasciati dalle cellule tumorali, prima che questi possano agire sull'endotelio o la matrice extracellulare. Infine, il terzo meccanismo, denominato «target-directed», previene la risposta delle cellule endoteliali agli stimoli angiogenetici inibendo, ad esempio, la sintesi e la migrazione delle cellule endoteliali⁸. Sebbene altri meccanismi patogenetici siano implicati nel processo di crescita tumorale^{8,34}, evidenze e dati clinici suggeriscono come l'angiogenesi influenzi negativamente la prognosi dei pazienti affetti da diverse neoplasie^{9,34} tra cui anche quelli della testa e del collo^{2,11,13,14,22,23,25,36}. È riconosciuto che l'angiogenesi

è necessaria non solo per la crescita tumorale ma anche per lo sviluppo delle metastasi²⁵ tanto che si riferisce da un lato che, l'assenza di angiogenesi, nelle fasi pre-neovascolari, sia alla base della mancata espansione e proliferazione delle cellule tumorali⁸, dall'altro che l'alto grado di vascolarizzazione, caratteristico della fase vascolare, potrebbe favorire, come supportato da studi recenti di diversi autori, la metastatizzazione^{18 24 35 36}.

La densità intratumorale dei microvasi (MVD) è comunemente considerata un indicatore di angiogenesi. Dalla letteratura emerge come la relazione tra MVD, metastasi e sopravvivenza per il carcinoma della testa e del collo sia alquanto controverso tanto che alcuni autori riportano una significativa associazione tra MVD, i parametri clinico patologici e la prognosi^{1 11 24 32 34} mentre la maggior parte non vi conferisce alcuna validità prognostica^{5 6 13 14 23 36}.

A nostra conoscenza solo alcuni lavori in letteratura conferiscono un'importanza prognostica all'angiogenesi per una sua correlazione tra formazione di neovasi, presenza di metastasi e comparsa di recidive locoregionali^{1 2 11 22 25 32}. Dev'essere inoltre sottolineato come i dati si riferiscano a casistiche limitate (da 20 a 70 pazienti), ad eccezione della casistica di Beatrice².

Dall'analisi critica dei dati emergono però due importanti considerazioni: risulta alquanto difficile comparare dati di sottosedi diverse, analizzati con metodiche di conta ed anticorpi differenti. Murray²⁵ riporta una correlazione significativa tra MVD (analizzata con anticorpo monoclonale) CD31, metastasi linfonodali e recidiva, solo su 22 casi in stadio I e II, non mantenendo una significatività statistica quando si considerano anche casi in stadio avanzato. Beatrice² riporta una significativa statistica valutando però i campioni con un cut-off particolarmente elevato (> 130/mm²) e con l'uso di un anticorpo monoclonale (anti-CD31) che risulta di difficile valutazione in presenza di reazione infiammatoria²⁸. Kuspit²² riporta unicamente una correlazione significativa con alcuni parametri clinico patologici senza conferire alla MVD una significatività prognostica indipendente.

Accanto a queste diversità intrinseche dei dati riportati è importante sottolineare come altri autori non conferiscono valore prognostico alla MVD per il carcinoma della testa e del collo^{4 6 13 14 23 28}.

In particolare su casistiche di carcinoma laringeo, il nostro gruppo²⁸ su 122 pazienti, Dray⁶ su 106 casi ed infine Burian⁴ su 41 casi, non riportano nessuna correlazione significativa tra MVD, parametri clinico patologici, sopravvivenza globale e libera da malattia. In linea con quanto sopra riportato va annoverato quanto riferito da Gleich¹³ su campioni di carcinoma del cavo orale dopo analisi con anticorpo monoclonale antiCD31 e fattore VIII: l'Autore non riporta alcuna correlazione tra aggressività tumorale locoregionale e prognosi. Infine Leedy²³ conferma in casi di carcinoma spinocellulare della lingua, dopo analisi multivariata, come l'angiogenesi non sia un marker clinico utile nel selezionare forme tumorali maggiormente aggressive.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

1. I dati riportati risultano difficilmente confrontabili tra loro in quanto ottenuti da casistiche differenti, per lo più esigue ed analizzati con anticorpi monoclonali e

metodiche diverse con intrinseche problematiche di conta e di tipizzazione. A questo proposito, dev'essere ricordato come spesso l'interpretazione sia complicata dalle difficoltà nel differenziare i vasi pre-esistenti dai vasi neoformati.

2. Il riscontro di un incremento del numero di neovasi, passando dalla mucosa normale alla displasia e al carcinoma, suggerisce che l'angiogenesi è un evento precoce nel processo di tumorigenesi del carcinoma della testa e del collo.

3. Dati discordanti sul ruolo prognostico dei fattori angiogenetici nel carcinoma della testa e del collo emergono da un'analisi critica dei dati. Tuttavia ci sembra di poter asserire, per quanto riportato dalla maggior parte degli autori, che in pazienti sottoposti ad intervento chirurgico l'angiogenesi non possa essere considerata allo stato attuale un fattore clinico prognostico indipendente per questo istotipo tumorale.

4. I dati appaiono contrastanti sul possibile ruolo dell'angiogenesi nello sviluppo delle metastasi linfonodali: da un lato alcuni ne supportano una correlazione asserendo che il processo di metastatizzazione è caratterizzato da una importante fase vascolare; altri ritengono che l'area testa-collo è altamente vascolarizzata e pertanto un tumore che origini da questa sede può essere meno dipendente per la sua crescita, rispetto ad una neoplasia a partenza da altre sedi, da una neovascolarizzazione.

5. L'angiogenesi sembra invece essere un indicatore nel predire la sensibilità della neoplasia a trattamenti complementari quali la radioterapia e/o chemioterapia: tumori maggiormente vascolarizzati manifesterebbero infatti una migliore risposta al trattamento per un aumento della ossigenazione cellulare che è strettamente dipendente dalla densità dei vasi sanguigni.

6. Deve essere però sottolineato che indipendentemente dalle difficoltà di valutazione comparativa di questi dati lo studio dei fattori regolatori della angiogenesi ha portato all'incremento sempre maggiore di ricerche mirate alla terapia antiangiogenetica. I ricercatori stanno infatti sperimentando nuovi approcci capaci di agire sulla neovascolarizzazione attraverso strategie terapeutiche mirate alla inibizione delle molecole angiogenetiche prodotte dalle cellule tumorali. Recentemente dati sperimentali e studi preliminari sembrano prospettare un potenziale impiego di farmaci tradizionali (FANS), di inibitori selettivi di attività enzimatiche (NOS2 e COX2), come agenti antiangiogenetici da affiancare alle terapie tradizionali

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Albo D, Granik MS, Jhala N, Atkinson B, Solomon MP. *The relationship of angiogenesis to biological activity in human squamous cell carcinomas of the head and neck*. Ann Plast Surg 1994;32:588-94.
- ² Beatrice F, Cammarota R, Giordano C, Corrado S, Ragona R, Sartoris A, et al. *Angiogenesis: prognostic significance in laryngeal cancer*. Anticancer Res 1998;18:4737-40.
- ³ Blood CH, Zetter BR. *Tumor interaction with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis*. Biochim Biophys Acta 1990;1032:89-118.
- ⁴ Burian M, Quint C, Neuchrist T. *Angiogenic factors in laryngeal carcinomas: do they have prognostic relevance*. Acta Otolaryngol 1999;119:289-92.
- ⁵ Carrau RL, Barnes EL, Snyderman CH, Petruzzelli G, Kachman K, Rueger R, et al. *Tumor angiogenesis as a predictor of tumor aggressiveness and metastatic potential in squamous cell carcinoma of the head and neck*. Invasion Metastasis 1995;15:197-202.

- 6 Dray TG, Hardin NJ, Sofferan RA. *Angiogenesis as a prognostic marker in earlyhead and neck cancer*. Ann Otol Rhinol Laryngol 1995;104:724-9.
- 7 Folkman J. *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. New Engl J Med 1971;18:1182-6.
- 8 Folkman J. *The role of angiogenesis in tumor growth*. Semin Cancer Biol 1992;3:65-71.
- 9 Fox SB, Leek RD, Weekes MP. *Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis*. J Pathol 1995;177:275-83.
- 10 Furcht LT. *Critical factors controlling angiogenesis: cell products, cell matrix and growth factors*. Lab Invest 1986;55:505-9.
- 11 Gasparini G, Weidner N, Maluta S, Pozza F, Boracchi P, Mezzetti M, et al. *Intratumoral microvessel density and p53 protein: correlation with metastasis in head-and-neck squamous-cell carcinoma*. Int J cancer. 1993;55:739-44.
- 12 Gimbrone MA, Conran RS, Folkman J. *Tumor growth neovascularization: an experimental model using rabbit cornea*. J Natl Cancer Inst 1974;52:413-27.
- 13 Gleich LL, Biddinger P, Duperier FD, Gluckman JL. *Tumor angiogenesis in T1 oral cavity squamous cell carcinoma: roile in predicting tumor aggressiveness*. Head and Neck 1996;18:343-6.
- 14 Gleich LL, Biddinger PW, Duperier FD, Gluckman JL. *Tumor angiogenesis as a prognostic indicator in T2-T4 oral cavity squamous cell carcinoma: a clinical-pathologic correlation*. Head Neck. 1997;9:276-80.
- 15 Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA, et al. *A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin*. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:6624-8.
- 16 Hanahan D, Folkman J. *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. 1996;86:353-64.
- 17 Hori A, Sasada R, Matsutani, Naito K, Sakura Y, Fujita T, et al. *Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody aganist human basic fibroblast growth factor*. Cancer Res 1991;51:6180-4.
- 18 Ikinger U, Terwey B, Wurster K, Manegold C, Moehring K. *Vascularization of malignant testicular tumors*. Urology 1985;26:41-4.
- 19 Jikihara H, Terada N, Yamamoto R, Nishikawa Y, Tanizawa O, Matsumoto K, et al. *Inhibitory effect of medroxyprogesteron acetate on angiogenesis induced by human endometrial cancer*. Am J Obstet Gynecol 1992;167:207-11.
- 20 Klagsbrun M, Knighton D, Folkman J. *Tumor angiogenesis activity in cells grown in tissue culture*. Cancer Res 1976;36:110-9.
- 21 Klagsbrun M, Folkman J. *Angiogenesis*. In: Sporn MB, Roberts AB, eds. *Handbook of experiental pharmacology, vol. 95 part 1. Peptide growth factors and their receptors*. New York: Springer Verlag 1990.
- 22 Kupisz K, Chibowski D, Klatka J, Klonowski S, Stepulak A. *Tumor angiogenesis in patients with laryngeal cancer*. Eur Arch Otorhinolaryngol 1999;256:303-5.
- 23 Leedy DA, Trune DR, Kronz JD, Weidner N, Cohen JL. *Tumor angiogenesis, the p53 antigen and cervical metastasis in squamous carcinoma of the tongue*. Head Neck Surg 1994;111:417-22.
- 24 Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. *Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer*. Lancet 1992;340:145-6.
- 25 Murray JD, Grant WC, McLaughlin K, Pennington M, Lynn M, DeRose PB, et al. *Tumor angiogenesis as a prognostic factor in laryngeal cancer*. Am J Surg 1997;174:523-6.
- 26 Petruzzelli GJ, Snyderman CH, Johnson JT, Myers EN. *Angiogenesis induced by head and neck squamous cell carcinoma xenografts in the chick embryo chorioallantoic membrane model*. Ann Otol Rhinol Laryngol 1993;102):215-21.
- 27 Petruzzelli GJ. *Tumor angiogenesis*. Head Neck 1996;18:283-91.
- 28 Pignataro L, Carboni N, Midolo V, Bertolini F, Buffa R, Cesana BM, et al. *Clinical relevance of microvessel density in laryngeal squamous cell carcinomas*. Int J Cancer 2001;92:666-70.
- 29 Polverini P, Leibovich S. *Induction of neovascularization in vivo and endothelial in vitro by tumor associated macrophages*. Lab Invest 1984;51:635-42.
- 30 Presta M, Rifkin DB. *New aspects of blood vessel growth: tumor and tissue-derived angiogenesis factor*. Haemostasis 1988;18:6-17.

- ³¹ Rastinejad F, Polverini PJ, Bouk NP. *Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene.* Cell 1989;56:345-55.
- ³² Shpitzer T, Chaimoff M, Gal R, Stern Y, Feinmesser R, Segal K. *Tumor angiogenesis as a prognostic factor in early oral tongue cancer.* Arc Otolaryngol Head Neck Surg 1996;122:865-8.
- ³³ Soker S, Fidler H, Neufeld G, Klagsbrun M. *Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor of tumor cell taht bind of VEGF 165 via its exon 7-encoded domain.* J Biol Chem 1996;271:5761-7.
- ³⁴ Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. *Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma.* N Engl J Med 1991;324:1-8.
- ³⁵ Weidner N, Carrol PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. *Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma.* Am J Pathol 1993;143:401-9.
- ³⁶ Zatterstrom UK, Brun E, Willen R, Kjellen E, Wennerberg J. *Tumor angiogenesis and prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck.* Head Neck 1995;17:312-8.

V.2. MOLECOLE DI ADESIONE

T. Martone, A. Cavalot, R. Albera, F. Palonta, P. Rosso, G. Cortesina

I rapporti tra cellula e matrice extracellulare (ECM) e tra cellula e cellula adiacente stanno alla base del mantenimento dell'architettura e della disposizione spaziale degli epiteli, condizionandone la crescita e la differenziazione. Tali interazioni sono mediate da molecole (recettori) di adesione che fanno parte della membrana cellulare (CM) e che appartengono alla famiglia di glicoproteine dimeriche dette integrine²². Si tratta di eterodimeri costituiti da due subunità di glicoproteine associate in modo non covalente: sono la subunità alpha (120-180 Kd) e quella beta (90-100 Kd)¹³. In situazioni normali queste molecole regolano i rapporti intercellulari e quelli tra cellule ed ECM, rapporti che stanno alla base di una corretta disposizione spaziale, e di processi di crescita e di differenziazione regolari.

Negli epiteli di rivestimento, in condizioni di normalità, vi è una precisa disposizione spaziale delle diverse integrine (Fig. 1): è stato infatti osservato che, nell'epidermide umana, i recettori per le integrine alpha 3-beta 1, alpha 6-beta 4, alpha 2-beta 1, alpha 5-beta 5, presentano una ben caratteristica e regolare distribuzione polare a livello dello strato basale dei cheratinociti¹². In particolare l'eterodimero alpha 6-beta 4 è espresso dalle cellule dello strato basale come costituente degli emidesmosomi, a diretto contatto con la lamina basale^{11 18 19}. Tale complesso si lega con specifici componenti della membrana basale (MB) che costituiscono le cosiddette zone della MB (MBZ) quali la laminina 1, la laminina 5/kallinina ed il collagene tipo IV. Queste proteine della ECM, insieme all'eparansolfato, ai proteoglicani e ad altre proteine, a livello della MB costituiscono uno specifico complesso proteico su cui poggiano i cheratinociti dello strato basale dell'epidermide¹⁷. È come se esistesse un «ingranaggio» di molecole proteiche che garantiscono un corretto posizionamento e una situazione di equilibrio dei cheratinociti dell'epidermide. Le integrine alpha 2-beta 1 e alpha 3-beta 1 sono invece presenti a livello della superficie laterale della CM, nelle zone di contatto tra cellule adiacenti: in queste zone sono state identificate anche le caderine, la vinculina e le desmoplachine che interagiscono con alpha 2-beta 1 e alpha 3-beta 1, intervenendo così nella regolazione delle interazioni cellulari^{4 5}.

Appare chiaro che il tipo di integrine espresse sulla CM, il loro numero, la loro disposizione spaziale, la loro polarità e i loro rapporti con i componenti della ECM sono fondamentali nel mantenimento della normale architettura degli epiteli e dei normali processi di crescita e di differenziazione. Quando tale architettura si sovverte e si alterano i normali rapporti tra cellula e cellula e tra cellule ed ECM (alte-

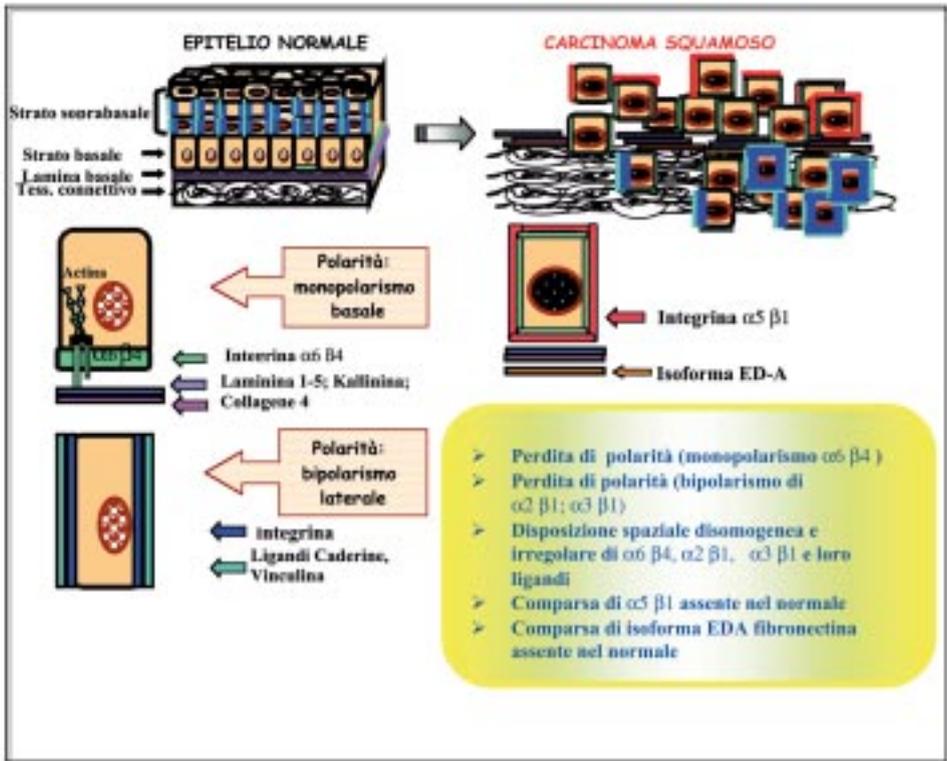


Fig. 1.

Schema di alterazione della disposizione spaziale delle molecole di adesione negli epiteli di rivestimento.

razione che è legata a modificazioni dell'attività delle molecole di adesione), il tessuto acquisisce capacità proliferative e di migrazione indiscriminate che sono tipiche della trasformazione tumorale¹⁸.

In tumori della mammella², della laringe⁷, del distretto cervico-facciale⁸, in tumori metastatici⁶ e in tumori ovarici³ è stata osservata una elevata percentuale di casi presentanti, allo studio con tecniche immunohistochemiche, alterazioni dell'espressione e della distribuzione spaziale di alcune integrine, con frequente perdita di polarità. In un lavoro di Iuliano et al., 1993¹⁰, viene approfondito il ruolo di alcune alterazioni integriniche in oncologia, che vengono definite come importanti fattori di invasione e progressione tumorale.

In Letteratura recente sono state osservate e sono state descritte alterazioni integriniche in carcinomi laringei²¹, della laminina 5 in carcinomi del cavo orale⁹, della laringe, del polmone e della mammella²⁰, della caderina E in HNSCC¹²³, di GMP 140, ELAM 1, VCAM 1, ICAM 1 in HNSCC¹⁴.

Il nostro gruppo di ricerca¹⁵¹⁶ ha compiuto uno studio immunohistochemico, su 80 pazienti con carcinoma squamoso della laringe, delle varie molecole di adesione

con rispettivi ligandi ai fini di verificarne un eventuale significato prognostico. Sono state studiate le integrine alpha 2-beta 1, alpha 3-beta 1, alpha 5, alpha 6-beta 4, le laminine 1-5, il collagene IV e le isoforme di fibronectina e tenascina. È stata usata la tecnica immunostochimica secondo il metodo ABC (complesso avidina-biotina-perossidasi) con l'impiego degli anticorpi monoclonali MAR 4 (vs. beta 1), MAR 6 (vs. alpha 6) AA3 e 3E1 (vs. beta 4), GB3 (vs laminina 5, kallinina), F2 (vs. alpha 3), IST 19 (vs. domain EDA della fibronectina), BC 1 (vs. domain ED-B fibronectina), BC 2 e BC 4 (vs. i differenti epitomi della tenascina), SAM 1 (vs. alpha 5) Gi 9 (vs. alpha 2), LAM 89 (vs. laminina 1) e COLL-94 (vs. il collagene IV).

La valutazione della positività è stata fatta con metodo micromorfologico con suddivisione in gruppi 0; 0,2; 0,5; 1; 2 definiti in base alla percentuale di cellule positive. È stato osservato che: 1) alpha 2-beta 1 e alpha 3-beta 1 perdono nel tumore completamente il loro orientamento polare (sulla superficie laterale delle cellule nello strato basale e sovrabasale dell'epitelio laringeo normale) e acquistano una distribuzione pericellulare venendo ad interessare le cellule interne al tumore. 2) Alpha 5-beta 1, non è normalmente presente nel tessuto laringeo normale, mentre è presente, variamente rappresentato, nel tumore. 3) Alpha 6-beta 4, nel tessuto normale ha una distribuzione lineare nello strato basale e sovrabasale con orientamento polare; nel tumore si osserva perdita della polarità (diventa pericellulare) ed è presente anche in profondità in tutto il contesto tumorale, in modo disomogeneo e disorganizzato. 4) Laminine 1-5 e collagene IV, nella mucosa normale hanno una distribuzione lineare lungo lo strato basale; nel tumore si osserva una netta discontinuità della colorazione. 5) Isoforme di fibronectina e tenascina: il domain ED-A della fibronectina nella mucosa normale è presente in modo uniforme sotto la membrana basale; nel tumore acquista una disposizione del tutto disomogenea. Il domain ED-B della fibronectina è assente nel tessuto laringeo normale, ma è presente diffusamente e abbondantemente nella ECM dei tumori. Le isoforme di tenascina nel tessuto laringeo normale sono distribuite nel polo distale della membrana basale, con positività perivasale; nel tumore appaiono aumentate e distribuite nei tralci peri e intratumorali.

Nelle Tabelle I e II sono riportate le differenze di alcuni patterns riguardanti le integrine studiate che presentano una netta significatività statistica (metodo T di Student) nel gruppo di pazienti a cattiva prognosi, rispetto a quello a buona prognosi.

I risultati descritti depongono per un sicuro significato prognostico di alcune caratteristiche (patterns) delle molecole di adesione studiate: la maggior perdita di polarità di alpha 2, alpha 3, beta 1, alpha 6, beta 4; la maggior perdita di linearità e disomogeneità di distribuzione diffusa delle stesse; la maggior perdita di linearità e positività nel contesto del tumore dei ligandi laminina 1, 5 e collagene IV; il maggior grado di frammentazione della distribuzione lineare degli stessi sono tutte evidenze che caratterizzano in modo statisticamente significativo i tumori con cattiva prognosi.

Questi patterns possono darci informazioni utili per: 1) la pianificazione terapeutica di trattamenti integrati; 2) per la diagnosi di interessamento metastatico di linfonodi in casi dubbi; 3) per la diagnosi di recidive o persistenza di malattia post radioterapia, in caso di lesioni non direttamente accessibili.

In un secondo studio abbiamo confrontato una casistica di carcinomi squamosi

Tab. I.

Patterns di espressione delle molecole di adesione nei carcinomi a buona e cattiva prognosi: analisi statistica.

	Polarità	P	Distribuzione	P
Alpha2	> perdita di polarità nel gruppo a cattiva prognosi	n.s.	Perdita di linearità e distribuzione diffusa > nel gruppo a cattiva prognosi	0,01
Alpha3	> perdita di polarità nel gruppo a cattiva prognosi	0,096	Perdita di linearità e distribuzione diffusa > nel gruppo a cattiva prognosi	0,031
Beta1	> perdita di polarità nel gruppo a cattiva prognosi	n.s.	Perdita di linearità e distribuzione diffusa > nel gruppo a cattiva prognosi	0,014
Alpha6	> perdita di polarità nel gruppo a cattiva prognosi	< 0,001	Perdita di linearità e distribuzione diffusa > nel gruppo a cattiva prognosi	0,002
Beta4(AA3)	> perdita di polarità nel gruppo a cattiva prognosi	< 0,001	Perdita di linearità e distribuzione diffusa > nel gruppo a cattiva prognosi	< 0,001
Beta4(3E1)	> perdita di polarità nel gruppo a cattiva prognosi	0,01	Perdita di linearità e distribuzione diffusa > nel gruppo a cattiva prognosi	0,01

Tab. II.

Pattern di espressione dei ligandi nei carcinomi a buona e cattiva prognosi: analisi statistica.

	Distribuzione	P	Grado di frammentazione	P
Laminina1	> tendenza a perdita di linearità e positività nel contesto del T nel gruppo a cattiva prognosi	0,003	> frammentazione nei tratti a distribuzione lineare nel gruppo a cattiva prognosi	0,001
Laminina5	> tendenza a perdita di linearità e positività nel contesto del T nel gruppo a cattiva prognosi	0,001	> frammentazione nei tratti a distribuzione lineare nel gruppo a cattiva prognosi	0,042
Collagene IV	> tendenza a perdita di linearità e positività nel contesto del T nel gruppo a cattiva prognosi	0,35	> frammentazione nei tratti a distribuzione lineare nel gruppo a cattiva prognosi	0,288

della laringe con una casistica di carcinomi dell'orofaringe. La sopravvivenza attuariale dei due gruppi di pazienti è stata significativamente peggiore ($p < 0,04$) nel gruppo di pazienti portatori di carcinoma dell'orofaringe. Il grado di irregolarità di distribuzione è risultato più accentuato nei tumori orofaringei con significatività statistica per alpha 2 ($p < 0,001$), alpha 3 ($p < 0,01$), beta 1 ($p < 0,05$), alpha 6 ($p < 0,01$), beta 4 ($p < 0,01$).

Alterazioni della polarità sono apparse più accentuate nei tumori orofaringei, con significatività statistica per alpha 3 ($p < 0,01$), alpha 6 ($p < 0,001$), beta 4 ($p < 0,05$).

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Riconsiderando il significato fisiologico delle integrine e dei loro ligandi, che è quello di regolare i rapporti tra cellula epiteliale e matrice extracellulare (ECM) e tra cellula e cellula adiacente, con la finalità ultima di garantire una certa architettura e disposizione spaziale oltre che gli scambi funzionali tra cellula e cellula e tra cellula ed ECM, già dal punto di vista teorico e razionale appare plausibile che alterazioni di queste molecole possano alterare il grado di coesione tra cellule ed ECM, favorendo processi di «migrazione» soprattutto se in presenza di stimoli proliferativi (come accade nei tumori).

I dati sperimentali attualmente tendono a dimostrare valida questa ipotesi. Le nostre ricerche condotte su gruppi di tumori a prognosi significativamente diverse, hanno dimostrato, con un buon grado di significatività, che le alterazioni della distribuzione spaziale e della polarità, a cui corrispondono alterazioni (per lo più interruzioni di linearità) dei ligandi si correlano con la prognosi peggiore.

Noi riteniamo che l'alterazione del patrimonio integrinico, sia un fattore di progressione che viene ad acquistare peso quando siano scattati i meccanismi carcinogenetici (oncogeni, growth factors, etc.).

BIBLIOGRAFIA

- 1 Andrews NA, Jones AS, Helliwell TR, Kinsella AR. *Expression of the E cadherin catenin cell adhesion complex in primary squamous cell carcinomas of the head and neck and their nodal metastases.* Br J Cancer 1997;75:1474-80.
- 2 Borsi L, Carnemolla P, Nicolò G, Spina B, Tanara G, Zardi L. *Expression of different tenascin isoforms in normal, hyoerplastic and neoplastic human breast tissues.* Int J Cancer 1987;52:688-92.
- 3 Bottini C, Miotti S, Fiorucci S, Facheris P, Menard S, Colnaghi MI. *Polarization of the alpha 6-beta4 integrin in ovarian carcinomas.* Int J Cancer 1993;54:261-7.
- 4 Carter WJ, Wayner EA, Bouchardts Kaur P. *The role of integrins alpha2-beta1 and alpha3-beta1 in cell-cell and cell-substrate adhesion of human epidermal cells.* J Cell Biol 1990;110:1378-404.
- 5 Cavani A, Zambruno G, Marconi A, Manca V, Marchetti M, Giannetti A. *Distinctive integrin expression in newly formed epidermis during wound healing in humans.* J Invest Dermatol 1993;101:600-4.
- 6 Chammas R, Bretani R. *Integrino and metastases: An overview.* Tumor Biol 1991;12:309-20.
- 7 Cortesina G, Bussi M, Carlevato MT, Ferro S, Panizzut B, Cavalot AL. *Significance of adhesion*

- molecules as biological prognostic factors in locally advanced laryngeal squamous cell carcinomas. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 1996;116:350-2.
- ⁸ Cortesina G, Sacchi M, Bussi M, Panizzut B, Ferro S, Carlevato MT, et al. *Integrin expression in head and neck cancers*. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 1995;115:328-30.
- ⁹ Haas KM, Berndt A, Stiller KJ, Hyckel P, Kosmehl H. *A comparative quantitative analysis of laminin 5 in the basement membrane of normal, hyperplastic, and malignant oral mucosa by confocal immunofluorescence imaging*. *J Histochem Cytochem* 2001;49:1261-8.
- ¹⁰ Iuliano RL, Varner IA. *Adhesion molecules in cancer: the role of integrins*. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:812-8.
- ¹¹ Jones JC, Kurpakus MA, Cooper HM, Quaranta V. *A function for the integrin alpha6-beta4 in the hemidesmosome*. *Cell Regul* 1991;2:427-38.
- ¹² Marchisio PC, Bondanza S, Cremona O, Cancedda R, De Luca M. *Polarized expression of integrin receptors (alpha6-beta4, alpha2-beta1, and alpha-beta5) and their relationship with the cytoskeleton and basement membrane matrix in cultured human keratinocytes*. *J Cell Biol* 1991;112:761-73.
- ¹³ Marchisio PC. *Integrins and tissue organization*. *Adv Neuroimmunol* 1991;1:213-30.
- ¹⁴ Neuchrist C, Lassmann H, Kornfehl J. *Migration-associated adhesion molecules in squamous cell carcinomas of head and neck*. *Onkologie* 2000;23:157-63.
- ¹⁵ Panizzut B, Carlevato MT, Ferro S, Cavalot AL, Gervasio CF, Ricci E, et al. *Adhesion molecules in squamous cell carcinoma of the larynx: possibile indication of prognosis*. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 1997;17:347-56.
- ¹⁶ Ricci E, Cavalot AL, sanvito F, Bussi M, Albera R, Staffieri A, et al. *Differential Expression and topography of adhesion molecules in laryngeal and oropharyngeal carcinomas*. *Acta Otolaryngol* 2001;122:234-40.
- ¹⁷ Savoia P, Trusolino L, Pepino E, Cremona O, Marchisio PC. *Expression and topography of integrin and basement membrane protein in epidermal carcinomas: basal but not squamous cell carcinomas display loss of alpha6-beta4 and BM600/nicein*. *J Invest Dermatol* 1993;101:352-8.
- ¹⁸ Spinardi L, Ren YL, Sanders R, Giancotti FG. *The beta4 subunit cytoplasmic domain mediates the interaction of the alpha6-beta4 integrin with the cytoskeleton of hemidesmosomes*. *Mol Biol Cell* 1993;4:871-84.
- ¹⁹ Stepp MA, Spurr Michaud S, Tisdale A, Elwell J, Gipson IK. *Alpha6-beta4 integrin heterodimer is a component of hemidesmosomes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:8970-4.
- ²⁰ Vitolo D, Ciocci L, Cicerone E, Rossi C, Tiboni F, Ferrauti P, et al. *Laminin alpha2 chain (merosin M chain) distribution and VEGF, FGF(2), and TGFbeta1 gene expression in angiogenesis of supraglottic, lung, and breast carcinomas*. *J Pathol* 2001;195:197-208.
- ²¹ Vitolo D, Ciocci L, Ferrauti P, Cicerone E, Gallo A, De Vincentiis M, et al. *Alpha5 integrin distribution and TGFbeta1 gene expression in supraglottic carcinoma: their role in neoplastic local invasion and metastasis*. *Head Neck* 2000;22:48-56.
- ²² Wollner DA, Nelson WJ. *Establishing and maintaining epithelial cell polarity. Roles of protein sorting, delivery and retention*. *J Cell Sci* 1992;102:185-90.
- ²³ Wu H, Lotan R, Menter D, Lippman SM, Xu XC. *Expression of E-cadherin is associated with squamous differentiation in squamous cell carcinomas*. *Anticancer Res* 2000;20:1385-90.

V.3. PROGRESSIONE TUMORALE E METASTATIZZAZIONE

T. Martone, R. Albera, F. Beatrice*, F. Palonta, G. Preti, G. Cortesina

Quando si parla di carcinogenesi, progressione e metastatizzazione, si legano strettamente i concetti di carcinoma, di invasione di questo nei tessuti circostanti e di metastatizzazione, là dove si intende per metastasi la diffusione del tumore da un organo ad un altro organo non direttamente connesso con esso ¹. Tutti i carcinomi del distretto cosiddetto testa e collo (HNSCC) hanno queste proprietà invasive e di metastatizzazione, in grado talora molto diverso, per motivi ancora in parte sconosciuti, ma che incominciano a essere oggetto, e con qualche risultato, di attente analisi. Cercheremo qui di sintetizzare alcuni concetti di biologia applicata alle metastasi (di Letteratura recente) per cercare di far capire i tipi di problemi che devono essere affrontati, che cosa si conosce oggi e che cosa si spera di conoscere domani.

LA BIOLOGIA DELLA COSIDDETTA CASCATA METASTATICA

È noto da tempo che non tutti i tumori danno metastasi; ed è classico il concetto che la metastasi è la risultante di uno sbilanciamento tra forze che favoriscono la progressione tumorale, e forze che ad essa si oppongono.

Oggi si incominciano ad avere dati più concreti e certi sulle caratteristiche di questi due tipi di forze in campo, da cui dipende il grado di aggressività di un tumore.

La metastasi è favorita dall'attivazione di oncogeni, dalla disattivazione o inibizione di geni onco-soppressori, dai livelli di presenza di fattori di crescita, di motilità e di alterazione delle molecole di adesione e dei loro ligandi, dalla secrezione di enzimi proteolitici, di metalloproteinasi e di citochine aventi azione angiogenetica e immunosoppressiva.

La metastatizzazione è invece inibita, da barriere anatomiche e strutturali, da un buon funzionamento di geni onco-soppressori, da un'efficiente risposta citotossica-immunitaria verso le cellule tumorali, da presenza di inibitori della sintesi di proteasi e dell'angiogenesi: a monte di questi fenomeni ci sono sicuramente particolari situazioni geniche, che però devono ancora essere precisate. È stato inoltre segnalato ¹³ che nell'ambito dello stesso tumore possono coesistere cloni cellulari ad alto potere metastatizzante con cloni a basso potere metastatizzante: nei primi si avrà ovviamente un prevalere dei fattori che facilitano la metastatizzazione, nei secondi un prevalere di quelli che la inibiscono.

II Clinica ORL, Università di Torino;

* Divisione ORL, A.S.O. «S. Giovanni Bosco» di Torino

Nelle pagine iniziali abbiamo descritto i fenomeni «multistep» della carcinogenesi, secondo i concetti più moderni di cui hanno il «padrinato» culturale Fearon ER e Volgestein B¹², ed è stato affermato che negli HNSCC hanno importanza l'attivazione di alcuni oncogeni, l'inattivazione di oncogeni soppressori e la sintesi di fattori di crescita^{8 29}: si è parlato di fattori che inducono sovraregolazione di proteine che attivano il ciclo cellulare (ciclina D1), e di sovraespressione di recettori per il fattore di crescita epidermico¹⁹. Così come si è ipotizzato (anche se in modo ancora non del tutto certo), che abbia importanza nella carcinogenesi e nella progressione degli HNSCC l'inattivazione dei geni onco-soppressori p53 ed Rb, i quali da un lato si oppongono, sul nascere, all'attivazione del protooncogene, e dall'altro esercitano il controllo della crescita soprattutto attraverso l'apoptosi^{7 20}. Tale inattivazione è pertanto causa di un prevalere dell'azione dei protooncogeni, che determina la nascita del tumore, e in parallelo la sua progressione, con perdita di ogni meccanismo di controllo omeostatico, che i geni onco-soppressori esercitano attraverso l'apoptosi. Le conseguenze di questo «sbilanciamento molecolare» sono favorite (con aumento della gravità dei fenomeni) da alcune condizioni dell'ospite, quali l'abuso di fumo e alcool^{23 37}. È stato dimostrato che l'HNSCC si sviluppa più facilmente in pazienti con storia di abuso di tabacco e che questi pazienti tendono ad avere una più alta frequenza di mutazioni di p53 e perdita di eterozigotità ai cromosomi 3p, 4q e 11q13. È stato inoltre osservato, utilizzando la tecnica della PCR, che il DNA del virus Papova (del papilloma) è più frequente nella mucosa di pazienti non fumatori, facendo pensare che questa sia la via molecolare alternativa nei pazienti non fumatori^{18 23}. Si può affermare, razionalizzando i risultati sperimentali, che le stesse alterazioni molecolari che sono responsabili della nascita di un HNSCC, sono altresì responsabili, quando le alterazioni superano un certo livello di soglia, della sua crescita e metastatizzazione.

La formazione della metastasi, superata la fase che possiamo definire oncogenetica, è strettamente legata allo sviluppo di un sistema vascolare intratumorale e quindi a quel fenomeno che viene definito come angiogenesi. Nelle pagine precedenti si è già parlato diffusamente di angiogenesi: qui desideriamo ribadire, in modo schematico, alcuni concetti.

1) I vasi sanguigni del tumore si formano a partire dalle cellule tumorali dell'ospite con reclutamento all'interno del tumore e assemblamento in microtubuli che rappresenta il momento cruciale dell'angiogenesi tumorale. I fondamentali lavori sperimentali di Folkman et al. (1990, 1992)^{14 15} di Liotta et al. (1991)²⁴ e di Petruzzelli GJ et al. (1996)³⁵ hanno dimostrato che la crescita del tumore è strettamente legata allo sviluppo di un sistema vascolare intratumorale e che questo è direttamente proporzionale alla velocità di crescita tumorale.

2) Sono state identificate citochine³³ che negli HNSCC sono in grado di stimolare la proliferazione e la successiva migrazione delle cellule endoteliali, condizionando l'espressione di recettori sulla superficie cellulare: esse sono costituite dal fattore basico di crescita dei fibroblasti (b-FGF), il fattore di crescita delle cellule endoteliali (VEGF) e il TGF-beta. L'associazione tra capacità del tumore a produrre vasi neoformati e potenzialità metastatica è stata osservata, oltre che negli HNSCC, nel carcinoma differenziato della tiroide^{4 5}, nel melanoma⁴⁰, nel carcinoma della mammella⁴⁶, nel carcinoma dell'ovaio, dell'endometrio, del polmone, della prostata, dell'esofago e nell'adenocarcinoma del colon^{6 16 21 27 38 43 45}. Gasparini et al.,

1993¹⁷, hanno osservato in 70 pazienti con HNSCC che la densità vascolare, studiata con l'anticorpo monoclonale endoteliale CD31 si correlava con l'incidenza di metastasi a distanza con un'alta significatività statistica ($p < 0,0046$), mentre non era predittiva per le metastasi linfonodali. In altri studi l'angiogenesi tumorale si è dimostrata essere correlata con le metastasi linfonodali di carcinomi della lingua, del pavimento bocca e del rinofaringe^{2,51}.

3) Oltre alle citochine attive sulle cellule endoteliali dell'ospite i tumori producono alcune proteinasi attive sulla matrice extracellulare (ECM). Esse sono legate a due punti della cascata metastatica. Il primo è rappresentato dall'ingresso nei vasi sanguigni e linfatici a livello del tumore primario; il secondo è rappresentato dalla fuoriuscita dai vasi a livello della sede della metastasi a distanza. Le proteinasi attaccano le strutture delle membrane basali e dell'ECM favorendo i processi di ingresso e fuoriuscita dai vasi^{25,26}. L'azione delle proteinasi presuppone che ci sia stata un'adesione della cellula tumorale alle membrane basali e alla ECM, e questo avviene attraverso l'intervento di alcune molecole di adesione (integrine) e dei loro ligandi. È stato osservato negli HNSCC che sono coinvolte in questo processo di adesione le integrine alpha 6-beta 4, le beta integrine 1-4, e i ligandi laminina e fibronectina^{22,36,41,44,47}. Al fine di limitare l'attività delle proteinasi derivate dal tumore, l'organismo si difende producendo inibitori delle proteinasi, quali alcuni inibitori delle metalloproteinasi (TIMP-1 e TIMP-2): queste sono proteine che prevengono la degradazione della ECM.

L'attività delle metalloproteinasi (MMP) è stata studiata negli HNSCC: sono state identificate specifiche MMP responsabili della degradazione del collagene I, II, III e IV, di cui sono stati anche definiti i tipi (tipo 1, 2, 3, 9)⁴⁹.

In studi di Charous SJ et al. (1997)⁹ è stato dimostrato che negli HNSCC la up regolazione dell'mRNA codificante le MMP si correla in modo significativo con l'aumentata invasione stromale e quindi con la progressione tumorale.

Un'altra classe di proteinasi studiate nella progressione degli HNSCC, è rappresentata dagli attivatori del plasminogeno²⁸. Queste proteinasi catalizzano la sintesi della plasmina dal plasminogeno, la quale è un enzima proteolitico che è in grado di degradare il collagene di tipo IV e la laminina. Il tipo di plasmina coinvolto negli HNSCC è quella di tipo urochinasico (U-PA)³¹. Clayman G et al. (1993)¹⁰ hanno dimostrato la up regolazione dell'mRNA per l'U-PA, e che un anticorpo monoclonale specifico per U-PA è in grado di prevenire l'invasione della membrana basale da parte del tumore.

Riassumendo si possono schematizzare i fenomeni descritti in questo modo: l'invasione del tumore nello stroma circostante è strettamente legata all'adesione delle cellule tumorali alla ECM e alla membrana basale dei vasi. Tale adesione è governata da alcune integrine e dai loro ligandi. La successiva azione di invasione tumorale si esercita attraverso l'intervento di alcune proteinasi (metalloproteinasi, plasmina e altre) che causano la degradazione della ECM e aprono la porta alla progressione delle cellule tumorali. Alcune citochine sintetizzate dal tumore stimolano la proliferazione di cellule endoteliali, la loro migrazione e l'assemblaggio finale in microtubuli vascolari che rappresentano la neoangiogenesi tumorale. È stato dimostrato che la formazione di vasi sanguigni neoformati intratumorali coincide con l'attecchimento e la crescita delle metastasi; e che in alcuni casi la quantificazione dell'angiogenesi tumorale risulta predittiva per la possibilità di metastasi linfonoda-

li e a distanza in alcuni tumori solidi.

Un altro punto chiave dei meccanismi della cascata metastatica è rappresentato dalla circolazione delle cellule tumorali e dal loro arresto in una sede a distanza. Si può affermare che un'alta percentuale di cellule tumorali è in grado di superare la barriera della parete dei capillari, e che solo una piccola percentuale è in grado di sviluppare una metastasi a distanza: si stima che soltanto lo 0,1% di tutte le cellule tumorali circolanti è in grado di sviluppare un tumore secondario. Le cellule tumorali vanno in circolo o come singole cellule, o come piccoli aggregati di cellule o come microemboli tumorali avvolti da una specie di «bozzolo» di fibrina: questo guscio di fibrina rappresenta un modo di difendersi del tumore dal riconoscimento e dall'attacco di cellule immunocompetenti del circolo (T linfociti, natural killers). In ogni caso la grande maggioranza delle cellule tumorali circolanti viene distrutta o dal trauma meccanico del torrente circolatorio, o dalle cellule linfatiche cui compete l'immunosorveglianza, oppure sarà trasportata in una sede anatomicamente sfavorevole allo sviluppo di una metastasi¹³. Le cellule tumorali in grado di dare metastasi a distanza agiscono attraverso diversi possibili meccanismi, concomitanti o in successione o isolati.

Essi sono:

1) gli emboli di cellule tumorali (che per lo più hanno «attaccati» linfociti e piastrine) s'ingrandiscono e vengono a «intasare» i singoli vasi: il tumore aderisce alla superficie interna del vaso e inizia a crescere, usurandola.

2) Le singole cellule tumorali aderiscono alla membrana basale esposta dal lato sottoendoteliale del lume capillare con un meccanismo strettamente legato alle integrine e ai loro ligandi: ci sarà un meccanismo di tipo pseudopodico delle cellule tumorali che per lo più prevale su di una specie di retrazione (a scopo difensivo) delle cellule endoteliali; e che in poche ore determina l'invasione delle cellule tumorali nel lume vascolare, con dissoluzione, talora, della membrana basilare.

3) Dopo una fase di equilibrio tra cellula tumorale che tende ad invadere, e cellula endoteliale che si difende, l'intervento di proteasi (di cui abbiamo già parlato in precedenza) faciliterà l'invasione tumorale nell'organo bersaglio^{24 25}.

La tappa successiva e finale, dopo che le cellule tumorali hanno superato la barriera endoteliale, è rappresentata dalla formazione di colonie cellulari nelle sedi secondarie, che vengono a formare la micrometastasi prima e la macrometastasi clinica poi.

Quando un embolo tumorale ha superato la barriera endoteliale e penetra nella sede secondaria, s'innescia a questo livello un movimento proliferativo con eventi del tutto analoghi a quelli già visti nel tumore primario: l'attacco alla matrice extracellulare (ECM) attraverso l'azione alterata di alcune integrine e dei loro ligandi, la produzione di proteinasi e l'angiogenesi, sostenuta, come già dicevamo, da fattori prodotti dal tumore.

Il fatto che la metastasi attecchisce soltanto in alcuni organi preferenziali viene spiegato oggi con la teoria di Fidler (1982)¹³ del «seme-terreno». I meccanismi sarebbero così ipotizzabili: 1) il tumore metastatizza ugualmente in tutti gli organi, ma cresce in modo preferenziale in sedi che forniscono particolari fattori di crescita (terreno); 2) le cellule tumorali hanno recettori specifici per le cellule endoteliali solo di certi organi bersaglio (seme); 3) le cellule tumorali circolanti hanno recettori per fattori chemiotattici specifici prodotti da certi organi bersaglio. Questi fattori

spiegano l'attrazione preferenziale dei tumori ad un organo bersaglio (seme-terreno)²⁸. Molti HNSCC e tumori maligni della tiroide hanno modelli anatomici di metastasi secondaria in organi a distanza preferenziale: essi metastatizzano più frequentemente nel polmone, che è il primo letto capillare incontrato dalle cellule tumorali circolanti; più raramente metastatizzano nel fegato, nell'osso e nell'encefalo.

I carcinomi adenoidocistici invece tendono a «viaggiare» lungo i nervi (diffusione perineurale) e si presenteranno come lesioni prossimali lungo i nervi cranici.

Un problema sostanziale nello studio dei meccanismi biologici della progressione e metastatizzazione del tumore, è quello di cercare, di identificare, qualora sia possibile, se esistono fattori predittivi biologici delle metastasi.

L'identificazione di particolari geni o di prodotti di geni (proteine) che possano predire l'incidenza di metastasi a distanza, sarebbe un fatto di notevole rilevanza clinica poiché permetterebbe di meglio pianificare (su basi più oggettive) una strategia terapeutica integrata.

Attualmente possono essere assolutamente confermate alcune evidenze legate alla valutazione istologica del tumore primitivo e dei linfonodi loco-regionali: a queste può essere assegnato, con buona significatività statistica, un ruolo predittivo nei confronti della metastatizzazione. Esse sono costituite dalla rottura capsulare dei linfonodi sede di metastasi, dall'embolizzazione intravasale da parte del tumore, dall'estensione extratiroidea nei tumori tiroidei³. Risultano inoltre avere valore prognostico, nei confronti sia della recidiva che della metastatizzazione, il tumor thickness, il grado di differenziazione, il pattern d'invasione, la risposta infiammatoria dell'ospite, l'invasione ossea e cartilaginea, lo stato dei margini di resezione³. Il pattern più studiato e con maggior significatività predittiva è rappresentato dalla rottura capsulare. De Carvalho (1998)¹¹ in uno studio su 170 pazienti ha osservato che i pazienti portatori di adenopatie metastatiche con rottura vascolare, avevano un rischio di recidiva e di metastasi a distanza aumentati di 3 volte (e quindi molto significativo).

Il gruppo coordinato da Petruzzelli (2001)³⁴ in una casistica di 157 pazienti con follow-up minimo di due anni, ha osservato che il gruppo con adenopatie metastatiche con rottura capsulare, aveva presentato metastasi a distanza e recidive in numero maggiore nei confronti del gruppo con adenopatie positive senza rottura capsulare, con una alta significatività statistica ($p = 0,001$).

L'affermarsi della biologia molecolare ha fatto proliferare gli studi nei quali è stato ricercato un significato predittivo per la metastatizzazione in qualche fattore molecolare legato al tumore o circolante.

Risultati incoraggianti si sono avuti dalle ricerche aventi come oggetto il significato prognostico di p53, ciclina D1 e p27, che hanno dimostrato, in alcuni studi, forti correlazioni con lo sviluppo di metastasi a distanza; invece le mutazioni del Ki-67, dell'Rb e delle proteine Bcl-2, Bax e Bak sono risultate meno predittive^{7,30,39,48}. Un ruolo predittivo per metastasi linfonodali è stato osservato da Cortesina et al. (1997)³² in uno studio sulle molecole di adesione del carcinoma laringeo: l'alto grado di disomogeneità di distribuzione e la perdita di polarità di alcune integrine, e l'interruzione della disposizione lineare di alcuni ligandi, si sono correlati in modo significativo con la metastatizzazione linfonodale.

Buoni risultati si sono avuti anche dagli studi di markers immunologici.

Nel gruppo coordinato da Petruzzelli GJ³⁴ è stato osservato che un alto conte-

nuto intratumorale di una popolazione di cellule CD34+ (per le quali è stata dimostrata una sicura azione immunosoppressiva) si correla significativamente con la recidiva locale e le metastasi a distanza^{42 50}. Poco incoraggianti sono invece al momento gli studi su markers tumorali sierici quali possibili strumenti di screening per lo sviluppo di recidive locali e metastasi a distanza.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Cancer. Molecular biology of the Cell*, 3° Ed. New York: Garland Publishing 1994.
- ² Albo D, Granik MS, Jhala N, Atkinson B, Solomon MP. *The relationship of angiogenesis to biological activity in human squamous cell carcinomas of the head and neck*. Ann Plast Surg 1994;32:588-94.
- ³ Barnes L. *Pathology of the head and neck: General considerations*. Myers EN, Suen JY, eds. *Cancer of the head and neck*, 3° Ed. Philadelphia: Saunders 1996:17-32.
- ⁴ Benefield J, Meisinger J, Petruzzelli GJ, Young MR. *Endothelial cell response to human head and neck squamous cell carcinomas involves downregulation of protein phosphatases-1/2A, cytoskeletal depolymerization and increased motility. Invasion metastasis*. 1997;17:210-20.
- ⁵ Benefield J, Petruzzelli GJ, Fowler S, Taitz A, Kalkanis J, Young MR. *Regulation of the steps of angiogenesis by human head and neck squamous cell carcinomas. Invasion metastasis*. 1996;16:291-301.
- ⁶ Bosari S, Lee AK, DeLellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML. *Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma*. Hum Pathol 1992;23:755-61.
- ⁷ 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;121:534-8.
- ⁸ Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. *Genetic progression model for head and neck cancer: implication for field cancerization*. Cancer Res 1996;56:2488-92.
- ⁹ Charous SJ, Stricklin GP, Nanney LB, Netterville JL, Burkey BB. *Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in head and neck squamous cell carcinoma*. Ann Otol Rhinol Laryngol 1997;106:271-8.
- ¹⁰ Clayman G, Wang SW, Nicolson GL, el-Naggar A, Mazar A, Henkin J, et al. *Regulation of urokinase-type plasminogen activator expression in squamous-cell carcinoma of the oral cavity*. Int J Cancer 1993;54:73-80.
- ¹¹ De Carvalho MB. *Quantitative analysis of the extent of extracapsular invasion and its prognostic significance: Prospective study of 170 cases of carcinoma of the larynx and hypopharynx*. Head Neck 1998;20:16-21.
- ¹² Fearon ER, Vogelstein B. *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell 1990;61:759-67.
- ¹³ Fidler IJ, Hart IR. *Biologic diversity in metastatic neoplasms: origins and implications*. Science 1982;217:998-1003.
- ¹⁴ Folkman J. *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?* J Natl cancer Inst 1990;82:4-6.
- ¹⁵ Folkman J, Ingber DE. *Inhibitors of angiogenesis*. Semin Cancer Biol 1992;3:89-96.
- ¹⁶ Frank RE, Saclarides TJ, Leurgans S, Speziale NJ, Drab EA, Rubin DB. *Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer*. Ann Surg 1995;222:695-9.
- ¹⁷ Gasparini G, Weidner N, Maluta S, Pozza F, Boracchi P, Mezzetti M, et al. *Intratumoral microvessel density and p53 protein: correlation with metastasis in head-and-neck squamous-cell carcinoma*. Int J Cancer 1993;55:739-44.
- ¹⁸ Gleich LL, Li YQ, Wang X, Stambrook PJ, Gluckman JL. *Variable genetic alterations and survival in head and neck cancer*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1999;125:949-52.
- ¹⁹ Grandis JR, Tweardy DJ. *The role of peptide growth factors in head and neck carcinoma*. Oto-

- laryndol Clin North Am 1992;25:1105-15.
- 20 Hotz MA, Bosq J, Zbaeren P, Reed J, Schwab G, Krajewski S, et al. *Spontaneous apoptosis and the expression of p53 and Bcl-2 family proteins in locally advanced head and neck cancer.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1999;125:417-22.
- 21 Kaku T, Kamura T, Kinukawa N, Kobayashi H, Sakai K, Tsuruchi N, et al. *Angiogenesis in endometrial carcinoma.* Cancer 1997;80:741-7.
- 22 Kimmel KA, Carey TE. *Altered expression in squamous carcinoma cells of an orientation restricted epithelial antigen detected by monoclonal antibody A9.* Cancer Res 1986;46:3614-23.
- 23 Koch WM, Lango M, Sewell D, Zahurak M, Sidransky D. *Head and neck cancer in nonsmokers: a distinct clinical and molecular entity.* Laryngoscope 1999;109:1544-51.
- 24 Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. *Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation.* Cell 1991;64:327-36.
- 25 Liotta LA. *Cancer cell invasion and metastasis.* Sci Am 1992;266:54-9, 62-3.
- 26 Liotta LA. *Tumor invasion and metastases – role of the extracellular matrix: Rhoads memorial Award lecture.* Cancer Res 1986;46:1-7.
- 27 Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. *Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer.* Lancet 1992;340:145-6.
- 28 Marcus G. *The relevance of plasminogen activators to neoplastic growth. A review of recent literature.* Enzyme 1988;40:158-72.
- 29 Myers EN. *Molecular pathogenesis of squamous cell carcinoma of the head and neck.* In: Myers EN, Suen JY. *Cancer of the Head and Neck, 3^o Ed.* Philadelphia: Saunders 1996:5-16.
- 30 Oh Y, Mao L. *Biomarkers in head and neck carcinoma.* Curr Opin Oncol 1997;9:247-56.
- 31 Ossowski L, Russo-Payne H, Wilson EL. *Inhibition of urokinase-type plasminogen activator by antibodies: the effect on dissemination of a human tumor in the nude mouse.* Cancer Res 1991;51:274-81.
- 32 Panizzut B, Carlevato MT, Ferro S, Cavalot AL, Gervasio CF, Ricci E, et al. *Adhesion molecules in squamous cell carcinoma of the larynx: possibile indication of prognosis.* Acta Otorhinolaryngol Ital 1997;17:347-56.
- 33 Petruzzelli GJ, Snyderman CH, Johnson JT, Myers EN. *Angiogenesis induced by head and neck squamous cell carcinoma xenografts in the chick embryo chorioallantoic membrane model.* Ann Otol Rhinol Laryngol 1993;102:215-21.
- 34 Petruzzelli GJ. *The biology of distant metastases in head and neck cancer.* ORL 2001;63:192-201.
- 35 Petruzzelli GJ. *Tumor angiogenesis.* Head Neck 1996;18:283-91.
- 36 Sakamoto N, Iwahana M, Tanaka NG, Osada Y. *Inhibition of angiogenesis and tumor growth by a synthetic laminin peptide, CDPGYIGSR-NH₂.* Cancer Res 1991;51:903-6.
- 37 Schantz SP, Hsu TC, Ainslie N, Moser RP. *Young adults with head and neck cancer express increased susceptibility to mutagen-induced chromosome damage.* JAMA 1989;262:3313-5.
- 38 Schoell WM, Pieber D, Reich O, Lahousen M, Janicek M, Guecer F, et al. *Tumor angiogenesis as a prognostic factor in ovarian carcinoma: quantification of endothelial immunoreactivity by image analysis.* Cancer 1997;80:2257-62.
- 39 Spafford MF, Koepp J, Pan Z, Archer PG, Meyers AD, Franklin WA. *Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1996;122:627-32.
- 40 Srivastava A, Laidler P, Davies RP, Horgan K, Hughes LE. *The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study.* Am J Pathol 1988;133:419-23.
- 41 Taitz A, Petruzzelli GJ, Lozano Y, Shankar R, Young MR. *Bi-directional stimulation of adherence to extracellular matrix components by human head and neck squamous carcinoma cells and endothelial cells.* Cancer Lett 1995;96:253-60.
- 42 Taitz A, Petruzzelli GJ, Pak AS, Wright MA, Matthews JP, Raslan WF, et al. *Immune parameters of mice bearing human head and neck cancer.* Cancer Immunol Immunother 1995;40:283-91.
- 43 Tanigawa N, Matsumura M, Amaya H, Kitaoka A, Shimomatsuya T, Lu C, et al. *Tumor vascularity correlates with the prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma.* Cancer 1997;79:220-5.
- 44 Van Waes C, Carey TE. *Overexpression of the A9 antigen/alpha 6 beta 4 integrin in head and neck*

- cancer. *Otolaryngol Clin North Am* 1992;25:1117-39.
- 45 Wakui S, Furusato M, Itoh T, Sasaki H, Akiyama A, Kinoshita I, et al. *Tumour angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study.* *J Pathol* 1992;168:257-62.
- 46 Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. *Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma.* *N Engl J Med* 1991;324:1-8.
- 47 Wolf GT, Carey TE, Schmaltz SP, McClatchey KD, Poore J, Glaser L, et al. *Altered antigen expression predicts outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck.* *J Natl Cancer Inst* 1990;82:1566-72.
- 48 Xie X, Clausen OP, De Angelis P, Boysen M. *The prognostic value of spontaneous apoptosis, Bax, Bcl-2, and p53 in oral squamous cell carcinoma of the tongue.* *Cancer* 1999;86:913-20.
- 49 Yoshizaki T, Sato H, Maruyama Y, Muroso S, Furukawa M, Park CS, et al. *Increased expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase in head and neck carcinoma.* *Cancer* 1997;79:139-44.
- 50 Young MR, Wright MA, Lozano Y, Prechel MM, Benefield J, Leonetti JP, et al. *Increased recurrence and metastasis in patients whose primary head and neck squamous cell carcinomas secreted granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and contained CD34+ natural suppressor cells.* *Int J Cancer* 1997.
- 51 Zatterstrom UK, Brun E, Willen R, Kjellen E, Wennerberg J. *Tumor angiogenesis and prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck.* *Head Neck* 1995;17:312-8.

VI. SIGNIFICATO CLINICO PROGNOSTICO DELLE ALTERAZIONI MOLECOLARI NEL CARCINOMA CERVICO-FACCIALE

L. Pignataro, T. Martone*, E. Arisi, D. Pagani, G. Cortesina*

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 squamocellulare della testa e del collo.

ANALISI DEI DATI DELLA LETTERATURA

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 regione¹⁷⁵. Le mutazioni di *p53* si associano frequentemente a sovra-espressione della proteina che può essere in questa forma riscontrata con tecniche immunostochimiche grazie all'incremento della sua emivi-

I Clinica ORL, Ospedale Maggiore Policlinico IRCCs, Università di Milano

* II Clinica ORL, Università di Torino

ta, altrimenti brevissima e come tale difficilmente evidenziabile (in caso di p53 normale o wild type).

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 ^{5 7 32 35 36 47 48 56 77 92 94 125-127 131 135 145 149 150 151 160 162 172 176 180 192 199}. In ricerche personali ¹⁵¹ condotte su 149 casi di carcinoma squamoso della laringe, è stato dimostrato un coinvolgimento di p53 (sovraespressione) nel 50,3% dei casi; l'analisi multivariata non ha però mostrato significatività statistica ($p = 0,9027$) sia per la sopravvivenza globale che libera da malattia, mentre è stata dimostrata per alcuni parametri clinici, quali la sede sopraglottica e le dimensioni del tumore.

Ciononostante non si può trascurare quanto riportato da altri che invece dimostrano una correlazione statisticamente significativa per comparsa di recidiva e sopravvivenza libera da malattia in pazienti con alterazione di p53 ^{17 68 72 83 86 130 134 171}. Di questi, solo 5 lavori analizzano casistiche relativamente ampie (da 69 a 114 casi) ^{17 72 83 86 130}, e solo 3, su campioni di carcinoma laringeo riportano dati sulla prognosi dopo analisi multivariata. In particolare Hirvikoski (1997) ⁷² in uno studio su 99 pazienti rileva un'alterazione del gene nel 68% dei casi dimostrando come la sovraespressione di p53 si associ con lo sviluppo di una recidiva ($p = 0,004$) e con la sopravvivenza ($p = 0,002$). Jin (1998) ⁸⁶ su 83 pazienti riporta una correlazione significativa tra casi p53 positivi e riduzione dell'intervallo libero da malattia ($p < 0,001$) conferendo a p53 un ruolo di fattore prognostico indipendente; infine Jackel (2000) ⁸³ su 88 pazienti evidenzia una correlazione statisticamente significativa tra alti livelli di p53 e ridotta sopravvivenza ($p = 0,0194$).

La recente dimostrazione che la radioterapia e/o la chemioterapia agiscono sulle cellule tumorali determinando apoptosi ha aperto nuove prospettive e studi circa il coinvolgimento di diversi geni tra cui p53 nella radio/chemio sensibilità: i primi dati sono da attribuire a Lowe (1994) ¹⁰⁶ ed a Kinzler (1994) ⁹¹ che dimostrano una correlazione tra mutazione del gene p53 e radioresistenza 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 ^{15 53 94 98 104 142 158 163 189}, altri invece gli conferiscono un significato prognostico. A questo riguardo si riporta come il controllo locoregionale e la comparsa di recidiva in pazienti trattati con radioterapia siano indipendentemente correlati alla mutazione di p53 ^{4 16 24 93 129 130 136 140 156 186}. In particolare Overgaard (1998) ¹⁴⁰ e Raybaud-Diogene (1997) ¹⁵⁶ 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) ¹⁸⁶ riporta una correlazione sia in analisi univariata che multivariata tra p53 mutata e prognosi infausta ($p = 0,0016$). Narayama (1998) ¹²⁹ 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 sovraespressione di p53, riscontrata nell'82% dei casi, e recidiva locoregionale ($p < 0,0001$). Infine Koch (1996)⁹³ su 110 pazienti e Alsner (2001)⁴ in due lavori con analisi di 114 e 58 pazienti con carcinoma della testa e del collo rilevano un rischio di recidiva locoregionale significativamente più alto per i pazienti con mutazione di p53 ($p = 0,02$ Koch; $p = 0,003$ e $p \leq 0,01$ per Alsner).

A riguardo della ricerca di una possibile correlazione tra p53 e trattamento chemioterapico Cabelguenne (2000)¹⁶ evidenzia alla analisi multivariata una correlazione significativa tra mutazione di p53 e mancata risposta terapeutica ($p \leq 0,004$), e Osaki (2000)¹³⁹ 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 ($p < 0,02$). Infine Bradford (1999)¹⁵ 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, soprattutto se si analizza criticamente quanto riportato da Soussi (2001)¹⁷⁵ e Takes (1998)¹⁷⁸. Il primo evidenzia come le mutazioni in una relativamente alta percentuale di casi possano essere riscontrate al di fuori delle regioni comunemente analizzate riportando come solo il 14% dei lavori analizzino l'intero gene e come il riscontro di un'alterazione di p53 negli esoni generalmente non valutati sia presente nel 13,6% dei casi. 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 od ad una mancata risposta ad uno specifico trattamento. L'autore conclude asserendo che per assumere una valenza prognostica p53 deve essere correlata al sequenziamento del DNA al fine di stabilire l'esatta sede della mutazione stessa¹⁷⁸. Takes infine 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^{107 177} 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 tumore¹⁴². 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^{6 26 103 123 143}, dello sto-

Tab. I.

Studi sul significato prognostico di p53 nel carcinoma della testa e del collo trattati chirurgicamente.

Autore	Numero campioni	% di espressione	% di mutazione	Correlazione con parametri clinico patologici	Correlazione con la recidiva locoregionale	Correlazione con la sopravvivenza
Pruneri	149	61%	28%	NO	NO	NO
Hirvikoski	99	68%		NO	SI	SI
Nakashima	92	47%		NO		
Nadal	89	64%		NO		NO
Salam	87	57%		NO		NO
Sarkar	61		31%			
Dursum	51	63%		NO		NO
Klatka	50	90%		NO		
Chomchai	45		33%	NO	NO	SI
Ioachim	44	40%		NO		NO
Michalides	115	42%			NO	NO
Dolcetti	30	73%			NO	NO
Friedman	69	55%		NO	NO	NO
Sittel	47	51%		NO	NO	
Stoll	107	50%				NO
Yuen 2001	85	52%		NO		NO
Yuen 2000	193	60%		SI	NO	NO
Pulkkinen	66	42%			NO	NO
Osaki	225	76%				SI
Jin	83	71%		NO	SI	
Jackel	88	77%		NO		SI
Nogueira	38		47%	NO	NO	
Hedge	39		33%		SI	SI
Caminero	106	43%			NO	SI
Shin	69	52%			SI	SI

maco^{108 193} e del colon^{79 97}. 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 recidiva⁹⁶ tanto che si ipotizza che questo riscontro in alcuni tipi di tumore potrebbe essere un utile e 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 autoanticorpi anti p53^{64 200}. 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 Barrett¹⁹ e in pazienti con leucoplachie del cavo orale¹⁵⁴ 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)²¹ e Gottschlich (2000)⁵⁸ rileva-

Tab. II.

Studi sul significato prognostico di p53 nel carcinoma della testa e del collo trattati con radio e/o chemioterapia

Autore	Numero campioni	% di espressione	% di mutazione	Correlazione con parametri clinico patologici	Correlazione con la recidiva locoregionale	Correlazione con la sopravvivenza
Gallo	85		45%	NO	SI	SI
Kokoska	70	61%			NO	
Pai	86	60%		NO	NO	NO
Saunders	35	48%	48%	NO		NO
Kropveld	36	86%	72%		NO	
Riva	36	41%			SI	
Bradford	178	57%			NO	NO
Lera	57	56%			NO	NO
Overgaard	68	66%	42%	SI	SI	SI
Narayama	67	46%			SI	
Cabelguenne	106		70%	NO		
Koch	110		44%	NO	SI	NO
Alsner	114		39%		SI	SI
Warnakulasuria	111	32%			SI	SI
Raybaud-Diogene	101	49%		SI	SI	
Awwad	79	53%			NO	NO
Gasparini	71	56%		SI	SI	SI
Giatromanolaki	76	46%			SI	NO
Homma	111	55%		SI	NO	NO
Nogueira	38		47%	NO	NO	
Oka	77	58%			SI	SI
Osaki	225	76%				SI
Tan	90	41%		NO		NO
Xie	85	61%			NO	NO
Wilson	99				NO	NO
Couture	304	44%			SI	SI
Obata	35		41%		SI	SI

no 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 rischio¹⁸⁴. Similmente, anche il valore prognostico di tali anticorpi è controverso. Da una parte Bourhis (1996)¹³ riporta una correlazione tra prognosi infausta e presenza nel siero di anti-p53, dall'altro Chow (2001)²¹ dimostra che alti livelli sierici preoperatori di anti-p53 di 75 pazienti con tumore del distretto cervicocefalico si associano significativamente con una maggior frequenza di metastasi linfonodali (65% vs. 27%, $p = 0,002$) senza riportare alcuna correlazione significativa tra presenza preoperatoria di anticorpi anti-p53 e sopravvivenza globale e libera da malattia (entrambe con $p > 0,05$), in linea con quanto riportato da Gottschlich (2000)⁵⁸ su una casistica di 109 carcinomi della testa e del collo.

Tab. III.

Correlazione tra p53 e sopravvivenza all'analisi multivariata.

Autore	N° Campioni Sede	Disease Free survival	Overall Survival
Awwad	79	NO	NO
Overgaard	68	SI	SI
Raybaud-Diogene	101	SI	
Kokoska	70	NO	NO
Alsner	114	SI	SI
Chomchai	45	NO	NO
Gasparini	71	SI	NO
Giatromanolaki	76	SI	NO
Gallo	85	SI	SI
Hirvikoski	99	NO	SI
Homma	111	NO	NO
Jin	83	SI	
Hedge	39	SI	SI
Koch	110	SI	NO
Lera	57	NO	NO
Oka	77	NO	NO
Jackel	88		SI
Yuen	193	NO	NO
Warnakulasuria	111	SI	SI
Camirero	106	NO	SI
Shin	69		
Michalides	115		

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.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Un'attivazione di p53 nel carcinoma della testa e del collo attraverso analisi immunostochimiche 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 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 Hodking 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 carcinoma 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 od a una scarsa risposta terapeutica rispetto ai pazienti con p53 normale o wild type o con altro tipo di mutazioni.

Diverse evidenze in letteratura dimostrano che questo gene può influenzare e modulare la risposta cellulare al trattamento radio-chemio terapeutico tanto che da un lato sono stati dimostrati i potenziali effetti radiosensibilizzanti di una p53 normale (p53wild type), dall'altro è riportato che il riscontro di mutazioni di p53 (p53M) impedisce alla cellule sottoposte a radio e/o chemioterapia di andare in apoptosi.

Ciclina D1, cdk e mutazioni di 11q13. Studi recenti dimostrano che la regolazione del ciclo cellulare e pertanto della progressione della cellula non dipende soltanto da checkpoints regolati dal gene oncosoppressore p53 e dall'Rb ma anche da altri meccanismi molecolari, come quello della ciclina D1 che attraverso il legame ciclina D/cdk4 e cdk6 attiva la proteina tumore soppressiva dell'Rb consentendo alla cellula di entrare nella fase S del ciclo cellulare^{160 168 169}. Evidenze suggeriscono che i geni regolatori del ciclo cellulare, particolarmente quelli coinvolti nel checkpoint ciclinaD/pRB possono essere targets di lesioni coinvolte nei processi di tumorigenesi^{166 167}. Il gene della ciclina D1, che frequentemente appare amplificato, regola la progressione del ciclo cellulare a livello del check point G1/S e la sua sovraespressione che segue costantemente l'amplificazione o il riarrangiamento del gene sembra contribuire all'oncogenesi guidando le cellule nella transizione dalla fase G1 alla fase S¹⁶⁹. Numerose ricerche hanno evidenziato come l'amplificazione e la sovraespressione del gene bcl-1 (PRAD-1/Ciclina D1) sul cromosoma 11q13 sia un evento comune nel carcinoma spinocellulare della testa e del collo^{1 10-12 14 44-46 84 101 111 117-120 124 128 134 144}. Benché la sovraespressione della ciclina D1 sia strettamente associata all'amplificazione genica ci sono prove della presenza di overespressione proteica anche in casi in cui non si è osservata amplificazione genica; la spiegazione di tale fenomeno non è, ad oggi, completamente chiarita^{1 49 101 144} tuttavia, alla luce dei dati riportati dalla nostra scuola¹⁴⁴, oggi può essere attuata una valutazione dello status del gene analizzandone l'espressione con tecniche immunohistochemiche.

Diverse sono le prove scientifiche che evidenziano come la trasfezione di cellule normali con ciclina D1 garantisca a queste un vantaggio selettivo di crescita de-

terminando una loro trasformazione in senso tumorale^{153 168}, come alterazioni sia quantitative che qualitative nella produzione del complesso proteico della ciclina D1 siano in grado di determinare una perdita nella regolazione della proliferazione cellulare³⁴ e come queste nei tumori del distretto testa-collo si associano ad una più aggressiva crescita del tumore ed una peggiore prognosi^{1 11 44 46 99 117-119 124 144}. Per ultimo, anche se ad oggi non è ancora completamente chiarito il loro ruolo nel processo di tumorigenesi del carcinoma squamocellulare della testa e del collo, sembra che alla crescita incontrollata delle cellule concorrano anche la presenza di amplificazione e sovra-espressione delle chinasi ciclina-dipendenti, specialmente delle cdk-4.

Alterazioni del gene bcl-1 sono state spesso osservate nei carcinomi squamocellulari della testa e del collo^{1 11 12 45 46 84 120} con una frequenza diversa a seconda delle sedi considerate: meno frequenti per carcinomi orofaringei e laringei^{101 124}, più frequenti per neoplasie a sede ipofaringea¹¹¹. Dalla letteratura emerge che l'amplificazione o la sovraespressione della ciclina D1, oltre a essere riscontrabile in tumori maggiormente aggressivi, si associ anche ad un'evoluzione clinica sfavorevole considerata come sopravvivenza globale legata ad una ripresa di malattia locale piuttosto che alla comparsa di metastatizzazione linfonodale^{1 11 14 101 111 118 119 124 128 144 178}.

I dati che conferiscono un ruolo prognostico a questo gene considerando casistiche relativamente ampie (da 73 casi a 149) si basano sulla valutazione dell'espressione del gene attraverso tecniche immunoistochimiche mediante l'uso di anticorpi monoclonali. A nostra conoscenza solo due autori considerano casistiche omogenee per sede quale la laringe^{34 144}. In particolare Pignataro et al. (1998)¹⁴⁴ analizzando campioni di tumore provenienti da 149 pazienti sottoposti a trattamento chirurgico concludono dopo analisi univariata e multivariata che la sovraespressione di ciclina D1 rappresenta un fattore prognostico indipendente sia per la comparsa di recidiva che per la sopravvivenza globale ($p = 0,0005$, $p = 0,0152$ all'analisi univariata; $p = 0,0238$, $p = 0,0622$ all'analisi multivariata).

Il riscontro in questa ricerca, di una sovraespressione in tutti i casi amplificati, suggerisce che l'analisi immunoistochimica possa essere un metodo sicuro per la valutazione di questo gene. Inoltre l'evidenza, in analisi multivariata, di una correlazione significativa tra sovraespressione di ciclina D1 con metastatizzazione linfonodale e prognosi, permette di osservare che la ciclina D1 può essere un utile marker da affiancare a quelli tradizionali per selezionare pazienti a prognosi infausta da sottoporre a follow-up più accurati ed a trattamenti più aggressivi. Il significato prognostico della ciclina D1 è inoltre confermata da Dong et al. (2001)³⁴ che riportano in uno studio effettuato su una casistica comprendente 102 pazienti, scelti in modo randomizzato su un totale di 408 soggetti sottoposti ad intervento chirurgico per carcinoma laringeo, come la ciclina D1 ed anche il CDK4 siano fattori prognostici indipendenti per il riscontro di una correlazione statisticamente significativa tra la loro sovraespressione, considerata come positività della molecola in almeno il 25% delle cellule neoplastiche, e la riduzione dell'intervallo libero da malattia e della sopravvivenza assoluta ($p < 0,0001$ e $p = 0,0008$ rispettivamente).

In riferimento a casistiche di tumori non selezionati ma comprendenti neoplasie a sede diversa della testa e del collo devono essere discussi i dati di Michalides (1995, 1997)^{118 119}, Kuo (1999)⁹⁹ e Akervall (1997)¹ che riportano in modo omogeneo una correlazione statisticamente significativa tra sovraespressione di ciclina D1 e prognosi infausta.

La più ampia casistica deve essere riferita a Michalides ^{118 119} che ha condotto uno studio su 115 pazienti, dei quali 13 presentavano più del 50% delle cellule neoplastiche positive per sovra-espressione della ciclina D1 (++), 44 presentavano positività nel 5-50% delle cellule (+), 12 nell'1-5% (\pm) riportando una significatività statistica tra sovraespressione della ciclina D1 ed intervallo libero da malattia ($p = 0,005$). Kuo ⁹⁹, su 88 pazienti, con neoplasie localizzate al distretto testa-collo (4 al labbro, 21 alla lingua, 29 alla gengiva, 3 al pavimento orale e 31 alla mucosa orofaringea) dimostra che i pazienti che presentavano neoplasie contenenti più del 10% di cellule positive per ciclina D1 presentavano una sopravvivenza assoluta significativamente inferiore rispetto al sottogruppo di pazienti considerati ciclina D1 negativi (espressione < del 10%) ($p = 0,046$). Infine Akervall ¹ su 75 pazienti affetti da carcinoma spinocellulare primitivo della testa e del collo, riscontra nel 41% dei casi una sovraespressione della ciclina D1 che si associa ad una sopravvivenza più bassa ($p = 0,047$) mantenendo una significatività all'analisi multivariata, da poter considerare questo gene un fattore prognostico indipendente.

A riguardo degli studi che correlano la sovraespressione della ciclina alla prognosi pare importante sottolineare quanto riportato da Masuda (1996) ¹¹¹ su una casistica selezionata di 42 casi di carcinoma ipofaringei. È riportata un'incidenza di sovraespressione del 54,8% più alta rispetto alle percentuali riscontrate nella altri sedi della testa e del collo e una correlazione significativa con la presenza di metastasi linfonodale ($p = 0,037$) e la prognosi ($p = 0,027$).

I dati riguardanti l'amplificazione del gene nel carcinoma squamocellulare della testa e del collo risultano esigui ^{1 11 84 101 134 144} particolarmente se riferiti alla prognosi ^{1 11 101 128 134}.

Namazie (2002) ¹²⁸ analizzando 103 pazienti affetti da carcinoma della testa e del collo, riporta una correlazione statisticamente significativa tra amplificazione del gene, recidive locoregionali ($p = 0,0212$), metastasi a distanza ($p = 0,0257$) e sopravvivenza a 36 mesi ($p = 0,0042$). In particolare l'autore riporta un 39% di recidive vs un 19,3% nei pazienti con amplificazione del gene. Akervall (1997) ¹ analizza il gene della ciclina D1 suddividendo 116 pazienti affetti da carcinoma della testa e del collo sulla base delle alterazioni strutturali interessanti la regione 11q13 (da k1, con cariotipo normale a k4 con almeno 4 differenti riarrangiamenti strutturali in un unico clone cellulare). I dati riportati evidenziano come il 90% dei pazienti portatori di mutazioni od altre alterazioni a carico della regione 11q13 sia deceduto a causa della neoplasia, contro il 46% dei pazienti privo di alterazioni genomiche ($p = 0,001$) e come la percentuale più alta di decessi, pari al 61%, si sia avuta nel sottogruppo di pazienti classificati come K4 rispetto agli altri gruppi considerati ($p = 0,02$). Infine gli altri autori riportano su casistiche differenti una correlazione statisticamente significativa tra amplificazione, recidiva locoregionale o sopravvivenza globale.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

1) Alla luce dei dati riportati in letteratura emerge come la sovraespressione di ciclina D1 ed anche l'amplificazione del gene siano associati ad una sopravvivenza libera da malattia e globale ridotta tanto che questo gene può essere considerato un

Tab. IV.

Studi sul significato prognostico della ciclina D1 nel carcinoma della testa e del collo.

Autore	Numero pazienti	% di espressione	% di amplificazione	Correlazione con la recidiva	Correlazione con la sopravvivenza	Analisi multivariata
Muller	178		57%			NO
Pignataro	149	32%		SI	SI	SI
Bova	148	68%		SI	SI	SI
Akervall	116				SI	SI
Michalides	115	49%		SI		
Dong	102	58%		SI	SI	SI
Akervall	75	41%	26%		SI	SI
Noguiera	56		34%	SI		NO
Bellacosa	51		18%		SI	SI
Kyomoto	45	53%	22%		SI	SI
Namazie	103		30%	SI	SI	(amplificazione) SI
Masuda	42	54%			SI	(amplificazione)

marker clinico prognostico indipendente per il carcinoma della testa e del collo da affiancare a quelli tradizionali per selezionare pazienti a prognosi infausta da sottoporre a trattamenti più aggressivi e/o a follow-up più ravvicinati.

2) Il riscontro da noi osservato che la sovraespressione della ciclina D1 sia riscontrabile, anche in alcuni casi non amplificati, benché non sia spiegabile da un punto di vista strettamente biologico, suggerisce che l'immunoistochimica possa essere la metodica di scelta per valutare lo stato di questo gene.

3) La significativa associazione tra sovraespressione di ciclina D1 e presenza di metastasi linfonodale anche in casi clinicamente valutati come N0 ma caratterizzati da una metastatizzazione subclinica (casi pN+) suggerisce come l'analisi immunoistochimica su campioni biotici di tumore, possa rappresentare un addizionale metodo per selezionare pazienti da sottoporre a svuotamento funzionale del collo o a trattamenti complementari.

4) Il riscontro di una più alta percentuale di alterazioni del gene ciclina D1 in sedi specifiche supporta quanto riportato da alcuni autori che sottolineano una possibile intrinseca diversità «biologica» del carcinoma originatosi da sedi diverse, capace di caratterizzare tumori con peculiari e specifiche propensioni cliniche.

p21. La *p21*, localizzata sul cromosoma 6p21.2, anche nota con il nome di WAF1 (wild-type p53 activated fragment 1) è una proteina coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare, in particolare nell'arresto della transizione tra fase G1 e fase S^{66 67 86}. La sua espressione è risultata aumentata in diversi tumori, dove è stata segnalata a livello del citoplasma ed è stata trovata essere associata alla prognosi in diverse neoplasie quali carcinomi del polmone, della mammella, della prostata e dello stomaco^{9 57 95 112}. Per i carcinomi della testa e del collo la rilevanza clinica di *p21* ad oggi non è ancora stata ampiamente chiarita; è stata osservata sovraespres-

sione in percentuali variabili tra il 30 e l'80%^{38 86 165 198 199}, tuttavia pochi sono i lavori che riportano dati relativi ad un suo ruolo prognostico.

Secondo i dati della letteratura non tutti gli autori sono concordi nell'attribuire a p21 un ruolo prognostico^{144 198 199}. In riferimento ad una possibile correlazione tra questo gene e la prognosi Yuen et al. (2000, 2001)^{198 199} riportano su 87 casi di carcinomi spinocellulari della lingua una sovraespressione di p21 nel 56% dei pazienti, con un riscontro statisticamente significativo in questo gruppo di pazienti (49 casi) di una maggior comparsa di recidive ed una ridotta sopravvivenza ($p = 0,0026$ e $p = 0,044$ rispettivamente). Erber (1997)³⁸ riporta su 42 casi di carcinomi della testa e del collo una correlazione statisticamente significativa tra sovraespressione di p21, riscontrata nel 67% dei casi, ed una ridotta sopravvivenza globale e libera da malattia ($p = 0,0071$ e $p = 0,0019$ rispettivamente) sostenendo che l'accumulo di p21 è compatibile con un incremento della attività proliferativa della cellula tumorale.

p27. La proteina p27, inibitore della progressione del ciclo cellulare, regola la progressione dalla fase G1 alla fase di sintesi attraverso un legame con il complesso ciclinaE-cdk2, cui consegue l'inibizione della chinasi e quindi il blocco della progressione del ciclo vitale della cellula con arresto della mitosi^{67 147}. È stato osservato come i livelli intracellulari di p27 aumentano in risposta all'inibizione da contatto ed in seguito a numerosi stimoli esterni antimitotici¹⁴⁶ e come questa oncoproteina sia espressa in quantità maggiori nelle cellule in stato di quiescenza rispetto a quanto non avvenga nelle cellule in attiva proliferazione^{3 18}. Da queste osservazioni numerosi ricercatori hanno cercato di comprendere un possibile ruolo di questo oncogene nei fenomeni di carcinogenesi. Secondo dati relativamente recenti è stato possibile dimostrare un suo coinvolgimento nelle varie fasi di sviluppo di differenti neoplasie tanto che l'espressione di p27 nelle cellule neoplastiche, a differenza delle mutazioni, invece raramente riscontrabili, è stata studiata come possibile indicatore del comportamento tumorale e del decorso clinico^{105 148}: l'assenza o il decremento della espressione di p27 è stato, infatti, associato ad una prognosi sfavorevole in diverse neoplasie^{23 39 43 105 122 148}.

Dalla letteratura si evince come la bassa espressione di p27 si riscontri in aree di mucosa displasica suggerendo che questo gene possa essere coinvolto anche nelle fasi precoci del processo di carcinogenesi⁸⁷.

La rilevanza clinica di p27 nei carcinomi della testa e del collo non è ancora stata adeguatamente investigata e definitivamente chiarita⁸⁹. Un numero di lavori relativamente ridotto riguardante p27, di cui tre riguardanti casistiche selezionate di carcinoma laringei, correlano l'espressione dell'oncogene alla prognosi riportando dati sostanzialmente univoci che conferiscono alla proteina p27 un ruolo clinico prognostico^{40 88 100 152 179}. Più in dettaglio il nostro gruppo di ricerca¹⁵² ha determinato il valore prognostico dell'espressione proteica di p27 nel carcinoma squamocellulare della laringe in 132 pazienti, riscontrando significatività statistica per l'intervallo libero da malattia e per la sopravvivenza assoluta all'analisi multivariata tale da poter considerare questa proteina un fattore prognostico indipendente nel carcinoma della laringe. Questi dati vengono inoltre confermati da Tamura (2001)¹⁷⁹, da Kapranos (2001)⁸⁸, Fujieda (1999)⁴⁰ e Kuo (2002)¹⁰⁰ tanto che questa univocità di riscontro consente di affermare che questo gene è un utile marker prognostico da

affiancare ai tradizionali parametri clinico patologici, capace di individuare pazienti con forme di carcinomi della testa e del collo più aggressive, da sottoporre a trattamenti complementari (RT e/o RT+CT) e a follow-up più ravvicinati. Per pazienti con carcinoma non a sede laringea Choi (2001)²⁰ e Mineta (1999)¹²¹ conferiscono al gene p27 in analisi multivariata una significatività statistica. In particolare Mineta¹²¹, in due successivi lavori, rileva su una casistica di 94 pazienti con carcinoma della lingua e su di 81 pazienti con carcinoma ipofaringeo che il gruppo di pazienti con alti livelli di p27 presenta una percentuale di sopravvivenza pari al 66% rispetto ad un 33% del gruppo con bassi livelli di p27.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

1) Il fatto che sia stato riportato un unico articolo che evidenzia una correlazione statisticamente significativa tra p21 e prognosi, ed oltre tutto limitato ai soli tumori della lingua, identifica una situazione di grande incertezza e di difficile possibilità di estensione del concetto a tutto il distretto testa e collo; nuovi studi devono necessariamente essere approntati prima di poter conferire un ruolo prognostico a questa proteina per i pazienti affetti da carcinoma spinocellulare della testa e del collo.

2) L'analisi critica dei dati su p27, permette di affermare che può essere considerata un fattore prognostico indipendente in quanto capace di identificare sottogruppi di tumori a bassa espressione ed a prognosi infausta sia per la sopravvivenza libera da malattia che la comparsa di recidiva. p27 può essere quindi valutata come un utile marker prognostico da affiancare ai tradizionali parametri clinico patologici per selezionare sottogruppi di pazienti da sottoporre a trattamenti più aggressivi e o complementari (radio e/o chemioterapia).

3) L'omogeneità delle metodiche di analisi e di conta, non riscontrabili per gli altri oncogeni, sembra contribuire alla univocità dei risultati e quindi a facilitarne il confronto.

4) L'ipotesi che la «down» regolazione di p27 possa determinare un decremento della adesione intercellulare alterando il sistema di adesione cellulare e favorendo pertanto la crescita tumorale e la metastatizzazione supporta il dato riscontrato dalla maggior parte degli autori di un correlazione tra bassi livelli di p27 e presenza di metastasi linfonodale locoregionale e/o a distanza confermando che alterazioni di questo gene si accompagnano a forme tumorali più aggressive.

5) Anche per questo oncogene come per la ciclina D1 si segnala il riscontro di differenti percentuali di espressione a seconda della sede considerata.

EGFR/Erb-B1. È uno dei primi oncogeni di cui si è dimostrato un coinvolgimento nel distretto testa e collo. codifica per il recettore del fattore di crescita epidermico (EGF) noto come EGF-R (Epidermal Growth Factor Receptor). Fisiologicamente il processo di proliferazione innescato dall'EGF è regolato sia dalla quantità di EGF presente che dalla disponibilità dei recettori; nelle cellule neoplastiche questo processo risulta incrementato in quanto sono presenti un abnorme numero di recettori: si riporta un loro incremento in una percentuale superiore al 50% nelle neoplasie della testa e del collo¹⁸⁵. Un aumentato livello di EGFR è riscontrabile in numerose neoplasie umane^{133 141 161 164}, l'amplificazione genica non sembra rivestire

un ruolo determinante, mentre sono probabilmente coinvolti l'incremento della trascrizione dell'RNA e l'iper-produzione proteica⁸². Si riportano, infatti, frequenze di iperespressione nell'ordine del 50-60%, di cui solo il 10% associate ad anomalie strutturali del gene, come amplificazione e riarrangiamento⁸¹.

Dalla analisi della letteratura emerge come i dati a riguardo della distribuzione dell'EGFR in relazione ai parametri clinico patologici siano esigui. A nostra conoscenza, solamente 5 lavori di cui 3 inerenti al distretto laringeo, correlano l'iper-produzione di EGFR alla prognosi dei pazienti affetti da carcinoma spinocellulare, e di questi solo 3 si basano su una relativa ampia casistica (da 91 a 140 casi).

Più in dettaglio, Maurizi et al. (1992, 1996)^{113 114} riportano dati riguardanti l'EGFR in pazienti affetti da carcinoma squamocellulare della laringe inizialmente su 103 e, successivamente su una casistica più ampia comprendente 140 pazienti. In particolare, gli autori nel primo lavoro¹¹³ hanno riscontrato che 51 dei 103 pazienti presentavano un incremento dell'EGFR, con un'associazione statisticamente significativa tra sovraespressione di EGFR e prognosi infausta ($p = 0,02$). Gli stessi autori in un lavoro successivo riportano¹¹⁴ che ben il 76% dei pazienti EGFR+ avevano recidivato localmente e che il 53% di questi aveva manifestato una sopravvivenza globale a cinque anni del 25% rispetto all'82% osservata nei pazienti EGFR negativi. Il significato prognostico di questo oncogene viene avvalorato dal mantenimento, in entrambi gli studi, di una significatività statistica alla analisi multivariata risultando insieme all'estensione del tumore il solo fattore prognostico indipendente.

Maurizi et al. (1996)¹¹⁵, sottolineano inoltre come alti livelli di EGFR siano correlabili con alti livelli di catepsina D in pazienti a stadio avanzato e con metastasi linfonodale supportando l'ipotesi che questo oncogene possa essere coinvolto anche nei meccanismi di invasione e metastatizzazione attraverso la regolazione di proteine (catepsina D, metalloproteinasi) coinvolte nei meccanismi di diffusione vascolare durante l'angiogenesi³⁷. La catepsina D è un'endopeptidasi alla quale, oltre ad essere stato attribuito, vista la sua attività proteolitica, un ruolo nella invasione neoplastica, è anche stato assegnato un effetto mitogeno in vitro. Già dai primi anni '90 è stata osservata un'aumentata concentrazione di catepsina D in alcune neoplasie umane tra cui il carcinoma spinocellulare della laringe⁴¹. Viene riportata dopo un'analisi su 63 pazienti¹¹⁵ una correlazione significativa tra la sovraespressione di catepsina D e peggioramento della prognosi, sia in termini di sopravvivenza assoluta ($p = 0,04$), sia di intervallo libero da metastasi ($p = 0,005$), mentre non significativo è il rapporto tra espressione e ripresa della malattia ($p = 0,10$). Smith (2001)¹⁷³ riscontra alla analisi multivariata una significativa riduzione di recidive ($p = 0,002$) in pazienti, con carcinoma della cavità orale e orofaringei, EGFR positivi, trattati con chirurgia e radioterapia. Infine Grandis et al. (1998)⁶⁰ hanno condotto uno studio su 91 pazienti affetti da carcinoma spinocellulare primitivo del distretto testa-collo, sottoposti a trattamento chirurgico, al fine di correlare l'espressione di EGFR alla prognosi insieme alla valutazione del TGF- α . Il TGF- α (transforming growth factor) è un ligando del recettore di membrana EGFR che Todd et al. (1989)¹⁸² hanno dimostrato essere coinvolto nel processo di trasformazione neoplastica di cellule di carcinoma squamocellulare della testa e del collo. Lo studio di Grandis⁶⁰ riporta alla analisi multivariata una correlazione statisticamente significativa tra elevati livelli di EGFR e di TGF- α e recidiva locoregionale e sopravvivenza globale ($p = 0,0001$).

ErbB-2/Her2-neu. Alla stessa famiglia degli oncogeni c-erb-B appartiene anche il gene c-erb-B2 o gene Her2-neu che è stato trovato frequentemente iperespresso in differenti neoplasie^{42 82 159}. Recenti studi sostengono l'ipotesi che l'oncoproteina erb-B2 agisca sulle caderine alterando il sistema di adesione cellulare e favorendo pertanto la crescita tumorale e la metastatizzazione¹⁹⁷. Nonostante sia generalmente accettato che c-erb-B2 abbia un ruolo importante nel definire l'aggressività del tumore, particolarmente per il carcinoma del polmone e della mammella, tuttavia queste conclusioni non sono esenti da critiche da parte di diversi autori tra cui Kay et al. (1994)⁹⁰, date le molteplici problematiche di interpretazione riferibili alla difficoltà di lettura dei campioni. Sebbene una sovraespressione di c-erb-B2 sia stata riportata in letteratura per il carcinoma della testa e del collo^{25 42 78} una correlazione tra questo oncogene e la prognosi è stata poco analizzata tanto che i dati appaiono esigui e per di più ampiamente contrastanti. Xia (1997)¹⁹⁵, Shiga (2000)¹⁷⁰ e Werkmeister (2000)¹⁸⁷ riportano una correlazione significativa tra c-erb-B2 e comparsa di recidiva locoregionale e ridotta sopravvivenza valutando l'amplificazione o l'espressione del gene.

Xia¹⁹⁵ riferisce, in uno studio condotto su 80 pazienti con carcinoma orale e trattati in prima istanza con terapia chirurgica, che la sovraespressione di c-erb-B2 riscontrata in 41 pazienti era significativamente associata con la ridotta sopravvivenza. Shiga¹⁷⁰ in uno studio simile, ma in casi trattati con terapia complementare (radio e/o chemioterapia) e su una casistica particolarmente esigua, comprendente solo 29 pazienti, riporta una correlazione significativa tra espressione di c-erb-B2 e comparsa di recidiva locoregionale e ridotta sopravvivenza ($p = 0,023$ e $p = 0,029$ rispettivamente).

Wekmeister¹⁸⁷ riscontra che l'amplificazione di questo gene si correla dopo analisi multivariata di 100 casi di carcinomi orali in modo statisticamente significativo ad una sopravvivenza ridotta ($p = 0,01$). Per contro Giatromanolakis (2000)⁵⁵ non conferisce nessun valore prognostico, dopo analisi di 89 casi con carcinoma avanzato della testa e del collo, non riscontrando nessuna associazione tra c-erb-B2, i parametri clinico-patologici, la risposta alla chemio o radioterapia e l'evoluzione prognostica.

Rb. Il gene che codifica la proteina Rb è localizzato sul cromosoma 13q. Alterazioni coinvolgenti questa regione costituiscono un evento relativamente frequente nei carcinomi della testa e del collo: i dati della letteratura riportano che circa il 50% di questi mostra una perdita allelica a carico di sequenze site in questa area cromosomica¹³². Le prime evidenze di una correlazione di Rb si devono a Maestro et al. (1993)¹⁰⁹ che, partendo dalla considerazione che spesso nelle neoplasie della testa e del collo si hanno alterazioni del braccio lungo del cromosoma 13, hanno ricercato una correlazione tra mutazioni del gene Rb ed insorgenza di carcinomi spinocellulari, senza evidenziare alcuna correlazione diretta tra mutazioni di Rb e neoplasia, ma riscontrando mutazioni in regioni molto vicine al gene stesso. A nostra conoscenza solo 2 lavori riportano una correlazione significativa tra questo gene e la prognosi nei carcinomi della testa e del collo. Dokiya (1998)³¹ dimostra una correlazione tra con la prognosi di pazienti affetti da neoplasia laringea riscontrando un'alterazione di pRb nel 92,1% degli 89 casi analizzati con una significativa ridotta sopravvivenza a 5 anni ($p = 0,0437$). Tanaka (2001)¹⁸¹ riporta dopo analisi mul-

tivariata su 122 casi di carcinoma del cavo orale una prognosi peggiore nei casi pRb2 negativi ($p = 0,0004$).

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

1) Dato il riscontro di un'alterazione di EGFR anche nelle aree non neoplastiche adiacenti al tumore il gene può essere considerato uno dei pattern molecolari precocemente alterati nel processo di carcinogenesi tanto che una sua sovraespressione potrebbe essere indice di potenziale evoluzione verso la malignità di un'area clinicamente e istologicamente sana. Inoltre questo gene sembra giocare un ruolo importante nella caratterizzazione molecolare in quanto capace di individuare tumori che a parità di stadiazione clinica manifestano una maggiore aggressività per un'intrinseca caratteristica biologica e pertanto da trattare con protocolli più aggressivi.

2) Dall'analisi della letteratura emerge come gli autori a riguardo della distribuzione dell'EGFR siano relativamente concordi nel conferire a questo gene un ruolo clinico prognostico. Inoltre, anche se esigui, i recenti dati riportati in letteratura sull'espressione di EGFR nei tumori trattati con radio e/o chemioterapia, suggeriscono un suo ruolo, insieme con altri parametri, come marker di chemio-sensibilità. Dal punto di vista clinico, ciò potrebbe avere un notevole impatto nella selezione di pazienti da sottoporre a protocolli integrati. Una possibile spiegazione di un suo coinvolgimento nei meccanismi di chemioradiosensibilità potrebbe essere ascritta alla stimolazione di un'attività proliferativa intrinseca della cellula tumorale, che la renderebbe più sensibile all'attività di agenti citotossici.

3) L'analisi dei dati sembra supportare un più importante ruolo, nella tumorigenesi di queste neoplasie, dell'espressione dell'RNA e quindi del recettore per l'EGF rispetto alla sua amplificazione genica tanto che la valutazione di questo gene potrebbe unicamente avvalersi di metodiche immunostochimiche.

4) Per il gene *cerb-B2* sebbene sia generalmente accettato un suo importante ruolo per definire l'aggressività del tumore in alcune neoplasie, per il carcinoma della testa e del collo non può essere conferita al momento una validità prognostica in quanto le uniche due casistiche relativamente ampie riportano dati antitetici. Inoltre emerge come gli studi comprendano pazienti sottoposti a trattamenti diversi e come siano riportate problematiche di interpretazione riferibili alla difficoltà di lettura dei campioni.

Bcl-2. *Bcl-2* è un oncogene, localizzato sul cromosoma 18q21, coinvolto nel ciclo cellulare e più precisamente nei meccanismi apoptotici; data la sua funzione in questa critica tappa di vita della cellula, è evidente un suo ruolo nel comportamento biologico dei tumori¹⁸¹. Benché la sua sovra-espressione sembri conferire, bloccando i meccanismi di morte programmata, un vantaggio di sopravvivenza selettivo per le cellule alterate, in letteratura i lavori riguardanti la prognosi sulle neoplasie del distretto testa-collo in relazione a questo dato sono poco numerosi e soprattutto assolutamente discordanti: per alcuni la sovraespressione si associa ad una prognosi peggiore mentre per altri invece influenza positivamente la sopravvivenza^{48 54 83 86 188 190 196}. Secondo alcuni, queste discordanze, potrebbero essere ascritte al fatto che

questo oncogene agisce in associazione con una proteina ad azione opposta ad esso correlata (gene *bax* ad azione proapoptica) capace di influenzarne l'attività: è infatti verosimile che sia un «balance» tra *bcl-2* e *bax* a determinare l'attivazione o meno dei processi apoptotici capaci di indirizzare la cellula neoplastica verso la morte o verso una selettiva proliferazione.

Dalla letteratura emerge come spesso non si conferisce a questo oncogene un valore prognostico per i pazienti affetti da carcinoma della testa e del collo trattati chirurgicamente^{48 86}. A nostra conoscenza solo 3 lavori, dei quali due su casistiche selezionate di carcinomi laringeo^{54 83} ed il terzo di carcinoma della lingua¹⁹⁶ conferiscono al gene una valenza prognostica e di questi unicamente due^{83 196} si basano su una casistica sufficientemente ampia (85 e 88 casi). Più in dettaglio Xie et al. (1999)¹⁹⁶ su 85 pazienti con neoplasia squamocellulare primitiva localizzata alla lingua riportano che i casi con elevata espressione di *bcl-2* hanno manifestato un intervallo libero da malattia significativamente inferiore rispetto a quelli *bcl-2* negativi ($p = 0,0262$). Inoltre i pazienti con un rapporto di espressione *bcl-2/bax* maggiore di 1 hanno presentato un decorso clinico significativamente meno favorevole rispetto al gruppo di casi caratterizzati da un rapporto minore di 1 ($p < 0,0001$). Infine questo andamento trova conferma da parte di Jäckel et al. (2000)⁸³ che riscontrano, in 84 campioni di carcinoma squamocellulare della laringe, a latere di una sovraespressione nel 54,5% dei casi, una correlazione significativa tra over-espressione di *bcl-2* ed ridotta sopravvivenza ($p = 0,011$).

A riguardo di pazienti trattati con terapia complementare si riportano i lavori di Gallo (1996, 1999)^{52 53} Hirvikoshi (1999)⁷³, Wilson (1996, 2001)^{188 190} e Trask (2002)¹⁸³. Gallo⁵² riscontra in 71 pazienti affetti da carcinoma della testa e del collo a stadio iniziale trattati con radioterapia una sopravvivenza libera da malattia e globale peggiore nei casi *bcl2/+* sia alla analisi univariata ($p = 0,08$ e $p = 0,004$) che multivariata ($p = 0,01$ e $p = 0,05$), confermando susseguentemente questi dati⁵³ su una casistica di 85 pazienti ($p = 0,004$ e $p = 0,012$). Wilson et al.^{188 190} hanno inizialmente su 93 pazienti riportato una correlazione significativa per una ridotta comparsa di recidive locoregionali e per una migliore sopravvivenza nei tumori *bcl-2* positivi ($p < 0,0016$ e $p < 0,012$ rispettivamente), susseguentemente valutando materiale istologico di 457 pazienti affetti da carcinoma spinocellulare del distretto testa-collo trattati con radioterapia (100 neoplasie orofaringee, 41 ipofaringee, 188 laringee, 56 della cavità orale, 2 dei seni paranasali e 13 del rinofaringe) hanno confermato i dati sopra riportati dimostrando alla analisi uni e multivariata una correlazione significativa tra la positività per *bcl-2* ed una migliore sopravvivenza, sia in senso assoluto sia come intervallo libero da malattia (rispettivamente $p = 0,04$ e $p = 0,02$ per l'analisi univariata e $p = 0,004$ e $p = 0,009$ per l'analisi multivariata). Infine Trask¹⁸³, analizzando *bcl-X₁*, gene della famiglia di *bcl-2* caratterizzato da una struttura simile, recentemente riporta che il riscontro di bassi livelli di *bcl-X₁* è associato ad una competenza della neoplasia ($p = 0,143$) con preservazione laringea ($p = 0,06$). Infine Hirvikoski⁷³ e lo stesso Trask¹⁸³ per il gene *bcl-2* non conferiscono alcun valore prognostico a questo oncogene.

Bax. È un oncogene anch'esso coinvolto nei complessi meccanismi di induzione della morte cellulare programmata come risposta a stimoli lesivi esterni. Come già accennato al paragrafo precedente, si tratta di una proteina che si oppone agli effetti di *bcl-2*, agendo dunque come promotore dell'apoptosi⁵⁴. *Bcl-2* e *bax*, inoltre,

risultano essere inversamente correlati tra loro, dato che un incremento della concentrazione di bax determina una riduzione di concentrazione di bcl-2 e viceversa. Dai dati della letteratura a nostra conoscenza solo un lavoro, di Xie et al. (1999)¹⁹⁶ identifica una correlazione di bax con la prognosi su 85 casi di carcinoma spinocellulare della lingua dimostrando alla analisi univariata sopravvivenza migliore nel sottogruppo di pazienti con un'overespressione dell'oncogene ($p = 0,0012$).

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

1) Alla luce di quanto riportato non è possibile conferire a questi geni un sicuro ruolo clinico prognostico per l'esiguità dei dati. Per il gene bcl-2 i dati appaiono contrastanti in quanto si riportano risultati antitetici a riguardo dell'evoluzione prognostica per i pazienti con riscontro di bcl-2 positivo sia in casistiche trattate chirurgicamente che con radioterapia. Queste discordanze da un lato potrebbero supportare l'ipotesi che la relazione tra questo gene e la risposta terapeutica sia specifica per ogni diverso organo, dall'altro la diversa risposta al trattamento chemioradioterapico potrebbe trovare una spiegazione nel fatto che l'alterazione di altri geni della famiglia di bcl-2 sono probabilmente coinvolti nel determinare ed influenzare i processi di riparazione cellulare.

2) Negli ultimi anni sempre maggiori evidenze indicano che alcuni geni possono favorire (geni-proapoptotici) od inibire (geni anti-apoptotici) l'apoptosi tanto che il fallimento radio o chemioterapico può essere attribuito ad un'individuale intrinseca resistenza della cellula neoplastica. Diversi studi sono stati attuati al fine di poter selezionare anche con dati biologici sottogruppi di tumori chemio e/o radiosensibili da sottoporre a procedimenti terapeutici integrati. Dalla analisi critica della letteratura a riguardo di bcl-2 emerge come siano presenti dati ampiamente discordanti tra loro che non permettono di trarre alcuna sicura considerazione.

MET/HGF-R. Il prodotto codificato dall'oncogene MET è una proteina transmembrana eterodimerica, con un dominio intracellulare ad attività tirosino-chinasica. Tale proteina si identifica con il recettore per l'Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor (HGF/SF), fattore noto per stimolare la motilità delle cellule in vitro. Nei tumori umani a occorrenza spontanea la lesione più frequente dell'oncogene MET è la sua iperespressione. Questa è stata descritta in alcuni tumori dal forte impatto sulla popolazione, come i carcinomi del colon-retto²⁸, i tumori pancreatici²⁹, quelli prostatici⁸⁰ e quelli della testa e del collo²². Alla sovraespressione si associa l'attività chinasi costitutiva del recettore, dalla quale può dipendere il potenziale trasformante e la stimolazione della motilità e dell'invasività. Questo è stato verificato, per esempio, su linee di carcinoma gastrico e pancreatico. Recentemente sono state trovate mutazioni nel dominio tirosino-chinasico del recettore Met in famiglie con tumori ereditari del rene⁸⁵. Queste mutazioni sono anche presenti in qualche caso di tumore renale sporadico dello stesso istotipo. In taluni gruppi familiari si associano, seppure raramente, carcinomi del colon retto e mammari. Tali dati dimostrano che il gene MET, attraverso il recettore per cui codifica, e il suo ligando HGF/SF, sia coinvolto nella patogenesi dei carcinomi, ma soprattutto nella loro progressione verso un comportamento invasivo e metastatico.

Nei lavori personali citati ^{22 30 50} è stato dimostrato che l'oncogene MET può rappresentare uno specifico marcatore di micrometastasi di HNSCC, essendo specifico per il tessuto epiteliale da cui il tumore deriva, e non essendo espresso nel tessuto linfatico.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Il valore prognostico di un'iperespressione di MET nel carcinoma squamocellulare della testa e del collo, dovrà essere suffragato da studi su casistiche più numerose: al momento attuale si può affermare che tale oncogene può essere validamente utilizzato per la diagnostica e quindi anche per la pianificazione di nuove strategie terapeutiche.

Attività Telomerasica

È stato dimostrato, in numerosi lavori, come l'attività telomerasica sia coinvolta in importanti step del processo di tumorigenesi di varie neoplasie ^{2 65 137}. Dalla letteratura per il carcinoma della testa e del collo emerge come solo 4 lavori mostrano dati sul coinvolgimento di attività di questo enzima ^{27 75 116 157}. Di questi solo 2 ^{116 27} riportano, anche se su casistiche esigue, dati riguardanti una correlazione tra telomerasi e parametri clinico-patologici; nessuna analizza questo enzima in rapporto alla sopravvivenza. Maurizi et al. (1997) ¹¹⁶ osservano, dopo un'analisi di 35 casi di carcinoma laringeo la presenza nel 89% dei pazienti di attività telomerasica evidenziando una correlazione statisticamente significativa tra telomerasi e stadio della malattia ⁷⁵. Gli stessi Autori inoltre riscontrano un «gradiente decrescente» di attività telomerasica passando dal tumore alla mucosa circostante. Curran (2000) ²⁷ riscontra 17 casi positivi alla telomerasi (85%) su 20 campioni di carcinomi della testa e del collo senza riscontrare alcuna correlazione con la sede, le dimensioni ed il grado ma evidenziando anch'esso modificazioni di questo enzima nel 20% delle aree di mucosa peritumorale analizzate.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

1) Al momento attuale gli unici due lavori riportati non permettono di considerare la telomerasi un marker clinico prognostico per il carcinoma della testa e del collo sia per problematiche di ordine metodologico che per la scarsità dei dati. Riguardo alla prima considerazione emerge dalla disamina della letteratura che, nonostante incoraggianti evidenze, vi sono ancora numerosi problemi da affrontare relativi alla specificità, sensibilità dei metodi utilizzati e all'interpretazione dei dati poiché, seppur le metodiche siano accurate e sensibili, questo enzima è espresso anche in cellule epiteliali dotate di un elevato potenziale proliferativo ed in linfociti attivati che potrebbero infiltrare il tessuto. Il riscontro di un'associazione significativa tra telomerasi e stadio avanzato della malattia unicamente permette di ipotizzare che tale attività sia preminente in corso di progressione della malattia od in presenza di metastatizzazione linfatica, pertanto in tumori caratterizzati da una maggiore aggressività ed invasività biologica intrinseca.

2) Il riscontro di attivazione della telomerasi in aree non neoplastiche sembra dimostrare come questo enzima sia presente nella fasi precoci del processo di carcinogenesi.

3) Il decremento della sua attività a distanza crescenti dal tumore, il riscontro a livello di lesione precancerosa displastica e iperplastica, ma non nel tessuto normale da un lato supporta l'ipotesi che il dosaggio della attività telomerasica sarebbe sensibile nell'individuare le cellule maligne che diffondono dal tumore dall'altro che questo enzima potrebbe costituire un segno per individuare aree suscettibili a degenerazione maligna, e un metodo per la precoce detezione di cloni e cellule maligne in aree di mucosa istologicamente negativa per neoplasia.

ALTERAZIONI MULTIPLE E SOPRAVVIVENZA

In letteratura si riporta come la contemporanea presenza di alterazioni multiple a carico di geni diversi si correli a forme maggiormente aggressive ed a prognosi sfavorevole: per i carcinomi della testa e del collo in particolare si riportano dati per i geni ciclina D1, p53, p27, p21 e bcl-2.

Il nostro gruppo di ricerca¹⁵¹ inizialmente riscontra in 149 pazienti affetti da carcinoma squamocellulare della laringe, sottoposti a trattamento chirurgico ed a valutazione dei geni p53 e bcl-2, una correlazione statisticamente significativa tra coespressione di bcl-2/p53 e le variabili anatomico-patologiche di grado istologico ($p = 0,003$), dimensione del tumore ($p = 0,008$), metastasi linfonodale ($p = 0,001$) e stadio clinico avanzato ($p = 0,001$). L'osservazione di un'associazione significativa per i casi p53+/bcl-2+ tra sopravvivenza ridotta e coespressione di p53/bcl-2 ($p = 0,0326$), porta a speculare che la completa inattivazione delle vie regolatrici dell'apoptosi possa nel carcinoma squamocellulare della laringe, in qualche modo, favorire lo sviluppo e la proliferazione delle cellule tumorali con conseguente peggioramento della prognosi. A conferma di questi risultati Jäckel (2000)⁸³ in 88 pazienti affetti da carcinomi squamocellulari della laringe riporta un peggioramento del tasso di sopravvivenza a 5 anni ($p = 0,0037$) nel sottogruppo di pazienti caratterizzati dalla presenza della stessa coespressione. Per studi comprendenti analisi di geni correlati ai meccanismi apoptotici Xie (1999)¹⁹⁶ rileva dopo analisi su 85 pazienti con carcinoma della lingua una prognosi infausta per i sottogruppi di pazienti che presentano elevata espressione di bcl2 e bax ($p < 0,0001$); Georgiou (2001)⁵⁴ su una casistica relativamente esigua, comprendente 38 pazienti affetti da carcinoma della laringe analizzati per l'espressione di bcl-2, bax e p53, riferisce un'incidenza di mortalità nei sottogruppi di pazienti con alterazione contemporanea di più geni, rispettivamente nei pazienti bcl-2-neg/p53neg ($p = 0,0305$) e bax-pos/bcl-2neg ($p = 0,0482$) e bax-pos/bcl-2-neg/p53neg ($p = 0,0088$). Lavertu (2001)¹⁰² riporta, su una casistica di pazienti con carcinoma della testa e collo trattati con chemioradioterapia, all'analisi multivariata, una più alta sopravvivenza globale con preservazione d'organo nel sottogruppo di pazienti con alterazione contemporanea di p53 e Ki67 ($p = 0,01$). Vengono riferite correlazioni statisticamente significative con la prognosi quando si considera il coinvolgimento contemporaneo delle cicline, in particolare la D e la E con altri oncogeni. Il nostro gruppo di ricerca¹⁵² evidenzia come i pazienti caratterizzati da un fenotipo quale ciclina D1+/p27- risultano avere, a dispet-

to del gruppo di pazienti ciclina D1-/p27+, alla analisi multivariata una sopravvivenza ridotta sia globale che libera da malattia ($p = 0,0015$, $p = 0,0001$ rispettivamente). Dong (2000, 2001)^{33 34} su 102 pazienti affetti da carcinoma squamocellulare primitivo della laringe riporta in un primo studio una correlazione statisticamente significativa tra la coespressione di ciclina E, PCNA e sopravvivenza libera da malattia ed assoluta ($p = 0,0001$ e $p < 0,0001$ rispettivamente) e susseguentemente sottolinea che i pazienti con coespressione di ciclina D1+ /CDK4+ risultavano quelli a prognosi peggiore ($p < 0,0001$). Nogueira (1998)¹³⁴ riscontra che la contemporanea alterazione del gene ciclina D1 e di p53 si associa a una comparsa di recidive e/o tumori metacroni con una riduzione del tempo di intervallo libero da malattia. Kapranos (2001)⁸⁸ su una casistica comprendente anche neoplasie a sede orale riporta dopo analisi immunoistochimica di p53, p21 e p27 una significativa influenza sulla sopravvivenza per la combinazione di questi oncogeni. In particolare il sottogruppo di pazienti p21-/p27+ e p53+/p21- manifestano una prognosi infausta.

Infine Namazie (2002)¹²⁸, su 103 pazienti, dimostra che la contemporanea alterazione dei geni ciclina D1 e p16, analizzati con la metodica FISH (fluorescenze in situ hybridization), si correla, sia in analisi univariata che multivariata, alla comparsa di recidive locoregionali ($p = 0,0130$), alla metastatizzazione a distanza ($p = 0,0034$) ed alla sopravvivenza globale ($p = 0,0030$). L'autore afferma che la particolare aggressività di alcune neoplasie potrebbe essere riferibile alla crescita incontrollata delle cellule, favorita dalla amplificazione di ciclina D1, in tumori caratterizzati anche da delezione di p16. In particolare, i pazienti caratterizzati dalla contemporanea presenza di amplificazione della ciclina D1 e dalla delezione del gene p16 avevano un rischio di circa 5 volte, 13 volte e 3 volte maggiore rispettivamente per recidive locoregionali, metastasi e morte.

Si riporta inoltre che la coespressione di recettori tirosino-chinasici appartenenti alla famiglia dell'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) (EGFR/erbB1, ERBB-2/Her2-neu, ERBB-3/Her3) rappresenta un fattore prognostico associato all'aggressività del tumore e correlato con una diminuzione della sopravvivenza globale e libera da malattia¹⁹⁴. Infine recentemente Ranelletti (2001)¹⁵⁵ in pazienti con carcinoma laringeo riporta come la combinazione di alti livelli di EGFR con bassi livelli di COX-2 si associa ad un follow-up di 5 anni ad un ridotto intervallo libero da malattia ed ad una più bassa sopravvivenza globale ($p = 0,01$ e $p = 0,0016$ rispettivamente).

A riguardo delle correlazioni tra alterazioni molecolari e trattamento complementare radio e/o chemioterapico dalla letteratura pochi lavori riportano dati significativi e su relative ampie casistiche. Gallo (1999)⁵³ su pazienti con carcinoma della testa e del collo trattati con radioterapia riporta una correlazione statisticamente significativa per una precoce comparsa di recidiva locoregionale e una ridotta sopravvivenza nei pazienti con simultanea presenza di p53 mutata e sovraespressione di bcl-2 ($p = 0,002$ e $p = 0,045$ rispettivamente), Giatromanolakis (2000)⁵⁵ su 89 pazienti sottoposti per neoplasia avanzata ad un trattamento radio/chemioterapico combinato riporta che i tumori *cerb2+* e CD34 negativi (low level di CD34) presentano una minor aggressività locoregionale rispetto ai tumori *cerb2-/CD34* negativi ($p = 0,001$) e *cerb2-/CD34* positivi (high level) ($p = 0,003$).

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

1) Benché gli autori riportino dati che considerano associazioni differenti questi risultati confermano quanto riportato per altre neoplasie: contemporanee alterazioni genetiche generalmente si associano a una evoluzione sfavorevole.

2) La peggior prognosi riscontrata nel sottogruppo di pazienti caratterizzati da un fenotipo quale ciclina D1+/p27- sembra riferibile da un lato all'azione della ciclina D1 capace di determinare un incremento della proliferazione cellulare, con susseguente maggiori possibilità di lesioni genetiche addizionali, dall'altro dalla bassa espressione ed attività di p27 la cui capacità intrinseca risulta essere quella inibitoria.

3) Il riscontro di una prognosi infausta nei pazienti caratterizzati da neoplasie con una contemporanea alterazione di geni coinvolti, come p53 e bcl-2, nel ciclo cellulare e nei meccanismi di apoptosi suggerisce una stretta correlazione di questi nel sistema di regolazione di morte cellulare. È probabile che l'inattivazione di p53 ed una up regolazione di bcl-2 possano portare ad una completa inibizione delle vie regolatrici dell'apoptosi, e nel carcinoma squamoso della laringe, in qualche modo favorire la proliferazione delle cellule tumorali, con conseguente peggioramento della prognosi.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Akervall JA, Michalides RJAM, Mineta H, Balm A, Borg A, Dictor MR, et al. *Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression.* Cancer 1997;79:380-9.
- ² Albanell J, Bosl GJ, Reuter VE, Engelhardt M, Franco S, Moore MA, et al. *Telomerase activity in germ cell cancers and mature teratomas.* J Natl Cancer Inst 1999;91:1321-6.
- ³ Alessandrini A, Chiaur DS, Pagano M. *Regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/kip1 in human malignancies.* Leukemia 1997;11:342-5.
- ⁴ Alsner J, 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.
- ⁵ Alsner J, Sorensen SB, Overgaard J. *TP53 mutation is related to poor prognosis after radiotherapy, but not surgery, in squamous cell carcinoma of the head and neck.* Radiother Oncol 2001;59:179-85.
- ⁶ Angelopoulou K, Diamandis EP, Sutherland DJ, Kellen JA, Bunting PS. *Prevalence of serum antibodies against the p53 tumor suppressor gene/protein in various cancer.* Int J Cancer 1994;58:480-7.
- ⁷ Assimakopoulos D, Kolettas E, Zagorianakou N, Evangelou A, Skevas A, Agnantis NJ. *Prognostic significance of p53 in the cancer of the larynx.* Anticancer Res 2000;20:3555-64.
- ⁸ Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. *Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53.* Science 1990;249:912-5.
- ⁹ Barbareschi M, Caffo O, Doglioni C, Veronese S, Bolzanini M, Dalla Palma P, et al. *p21 WAF1 immunohistochemical expression in breast carcinoma. Correlations with clinicopathological data, oestrogen receptor status, MIB1 expression, p53 gene and protein alterations and relapse free survival.* Br J Cancer 1996;74:208-15.
- ¹⁰ Bartkova J, Lukas J, Muller H, Strauss M, Gusterson B, Bartek J. *Abnormal patterns of D-type cyclin expression and G1 regulation in human head and neck cancer.* Cancer Res 1995;55:949-56.
- ¹¹ Bellacosa A, Almadori G, Cavallo S, Cadoni G, Galli J, Ferrandina G, et al. *Cyclin D1 gene amplification in human laryngeal squamous cell carcinomas. Prognostic significance and clinical implications.* Clin Cancer Res 1996;2:175-80.

- ¹² Berenson JR, Yang J, Mickel RA. *Frequent amplification of bcl-1 locus in head and neck carcinomas*. *Oncogene* 1989;4:1111-6.
- ¹³ 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.
- ¹⁴ Bova RJ, Quinn DI, Nankervis JS, Cole IE, Sheridan BF, Jensen MJ, et al. *Cyclin D1 and p16INK4A expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue*. *Clin Cancer Res* 1999;2:175-80.
- ¹⁵ 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.
- ¹⁶ Cabelguenne 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.
- ¹⁷ Caminero MJ, Nunez F, Suarez C, Ablanado P, Riera JR, Dominguez F. *Detection of p53 protein in oropharyngeal carcinoma. Prognostic implications*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;122:769-72.
- ¹⁸ Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, et al. *Decreased levels of the cell cycle inhibitor p27 protein: prognostic implications in primary breast cancer*. *Nature Med* 1997;2:27-30.
- ¹⁹ Cawley HM, Meltzer SJ, de Benedetti VM, Hollstein MC, Muehlbauer KR, Liang L, et al. *Anti p53 antibodies in patients with Barrett's esophagus or esophageal carcinoma can predate cancer diagnosis*. *Gastroenterology* 1998;115:19-27.
- ²⁰ Choi CS, Choi G, Jung KY, Choi JO, Chae YS. *Low expression of p27 Kip1 in advanced mucopidermoid carcinomas of head and neck*. *Head Neck* 2001;22:292-7.
- ²¹ 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.
- ²² Cortesina G, Martone T, Galeazzi E, Olivero M, De Stefani A, Bussi M, et al. *Staging of head and neck squamous cell carcinoma using the MET oncogene product as marker of tumor cells in lymph node metastases*. *Int J Cancer* 2000;89:286-92.
- ²³ Cote RJ, Shi Y, Groshen S, Feng AC, Cordon-Cardo C, Skinner D, et al. *Association of p27Kip1 levels with recurrence and survival in patients with stage C prostate carcinoma*. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:916-20.
- ²⁴ Couture C, Raybaud-Diogene H, Tetu B, Bairati I, Murry D, Allard J, et al. *p53 and Ki67 as markers of radioresistance in head and neck carcinoma*. *Cancer* 2002;94:713-22.
- ²⁵ Craven JM, Pavelic ZP, Stambrook PJ, Pavelic L, Gapany M, Kelley DJ, et al. *Expression of c-erbB-2 gene in human head and neck carcinoma*. *Anticancer Res* 1992;12:2273-6.
- ²⁶ Crawford L, Pim DC, Bulbrook RD. *Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer*. *Int J Cancer* 1982;30:403-8.
- ²⁷ Curran AJ, Gullane PJ, Irish J, Macmillan C, Freeman J, Kamel-Reid S. *Telomerase activity is upregulated in laryngeal squamous cell carcinoma*. *Laryngoscope* 2000;110:391-6.
- ²⁸ Di Renzo MF, Olivero M, Giacomini A, Porte H, Chastre E, Mirossay L, et al. *Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer*. *Clin Cancer Res* 1995;1:147-54.
- ²⁹ Di Renzo MF, Poulosom R, Olivero M, Comoglio PM, Lemoine NR. *Expression of the Met/hepatocyte growth factor receptor in human pancreatic cancer*. *Cancer Res* 1995;55:1129-38.
- ³⁰ Di Renzo MF, Olivero M, Martone T, Maffe A, Maggiora P, Stefani AD, et al. *Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas*. *Oncogene* 2000;19:1547-5.
- ³¹ Dokiya F, Ueno K, Ma S, Eizuru Y, Furuta S, Ohyama M. *Retinoblastoma protein expression and prognosis in laryngeal cancer*. *Acta Otolaryngol* 1998;118:759-62.
- ³² Dolcetti R, Dogliani C, Maestro R, Gasparotto D, Barzan L, Pastore A, et al. *p53 overexpression is an early event in the development of human squamous cell carcinoma of the larynx: genetic and prognostic implications*. *Int J Cancer* 1992;52:178-82.
- ³³ Dong Y, Sui L, Tai Y, Sugimoto K, Hirao T, Tokuda M. *Prognostic significance of cyclin E over-*

- repression in laryngeal squamous cell carcinomas.* Clin Cancer Res 2000;6:4253-8.
- 34 Dong Y, Sui L, Sugimoto K, Tai Y, Tokuda M. *Cyclin D1-CDK4 complex, a possible critical factor for cell proliferation and prognosis in laryngeal squamous cell carcinomas.* Int J Cancer 2001;95:209-15.
- 35 Dunphy CH, Dunphy FR, Boyd JH, Varvares MA, Kim HJ, Lowe V, et al. *Expression of p53 protein in advanced head and neck squamous cell carcinoma before and after chemotherapy.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1997;123:1223-5.
- 36 Dursun G, Sak SD, Akyol G, Dursun A, Ereku S, Demireller A, et al. *Overexpression of p53 in laryngeal carcinoma: clinicopathological implications.* Ear Nose Throat J 1995;74:645-8.
- 37 Eccles SA, Modjtahedi H, Box G, Court W, Sandle J, Dean CJ. *Significance of c-erb family of receptor tyrosine kinases in metastatic cancer and their potential as target for immunotherapy.* Invasion metastasis 1994;14:337-48.
- 38 Erber R, Klein W, Andl T, Enders C, Born AI, Conrad C, et al. *Aberrant p21 protein accumulation in head and neck cancer.* Int J Cancer 1997;74:383-9.
- 39 Esposito V, Baldi A, De Luca A, Groger AM, Loda M, Giordano GG, et al. *Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer.* Cancer Res 1997;57:3381-5.
- 40 Fujieda S, Inuzuka M, Tanaka N, Sunaga H, Fan GK, Ito T, et al. *Expression of p27 is associated with progression and prognosis in laryngeal cancer.* Laryngoscope 1999;109:815-20.
- 41 Ferrandina G, Scambia G, Benedetti Panici P, Almadori G, Paludetti G, Cadoni G, et al. *Catepsin D in primary squamous laryngeal tumours: correlation with clinicopathological parameters and receptor status.* Cancer Lett 1992;67:133-8.
- 42 Field JK, Spandidos DA, Yiagnosis M, Gosney JR, Papadimitriou K, Stell PM. *C-erbB-2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck.* Anticancer Res 1992;12:613-9.
- 43 Florenes VA, Maelandsmo GM, Kerbel RS, Slingerland JM, Nesland JM, Holm R. *Protein expression of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 in malignant melanoma: inverse correlation with disease-free survival.* Am J Pathol 1998;153:305-12.
- 44 Fortin A, Guerry M, Guerry R, Talbot M, Parise O, Schwaab G, et al. *Chromosome 11q13 gene amplifications in oral and oropharyngeal carcinomas: No correlation with subclinical lymph node invasion and disease recurrence.* Clin Cancer Res 1997;3:1609-14.
- 45 Fracchiolla NS, Pignataro L, Capaccio P, Trecca D, Boletini A, Ottaviani A, et al. *Multiple genetic lesions in laryngeal squamous cell carcinomas.* Cancer 1995;75:1292-301.
- 46 Fracchiolla NS, Pruneri G, Pignataro L, Carboni N, Capaccio P, Boletini A, et al. *Molecular and immunohistochemical analysis of bcl-1/cyclin D1 gene in laryngeal squamous cell carcinomas: correlation of protein expression with lymph-node metastasis and advanced clinical stage.* Cancer 1997;79:1114-21.
- 47 Frank JL, Bur ME, Garb JL, Kay S, Ware JL, Sismanis A, et al. *p53 tumor suppressor oncogene expression in squamous cell carcinoma of the hypopharynx.* Cancer 1994;73:181-6.
- 48 Friedman M, Lim JW, Manders E, Schaffner AD, Kirshenbaum GL, Tanyeri HM, et al. *Prognostic significance of bcl-2 and p53 expression in advanced laryngeal squamous cell carcinoma.* Head Neck 2001;280-5.
- 49 Gaffey MJ, Iezzoni JC, Meredith SD, Boyd JC, Stoler MH, Weiss LM, et al. *Cyclin D1 (PRAD1, CCND1) and glutathione-S-transferase gene expression in head and neck squamous cell carcinoma.* Hum Pathol Cancer Res 1995;26:1221-6.
- 50 Galeazzi E, Olivero M, Gervasio FC, De Stefani A, Valente G, Comoglio PM, et al. *Detection of MET oncogene/hepatocyte growth factor receptor in lymph node metastases from head and neck squamous cell carcinomas.* Eur Arch Otorhinolaryngol 1997;254(Suppl 1):S138-43.
- 51 Galli J, Almadori G, Cadoni G, Maurizi M. *I marker tumorali nel cancro della laringe possono guidare la scelte terapeutiche?* In: Relazione «le nuove frontiere della Medicina e della Chirurgia in Otorinolaringoiatria» VII Congresso A.I.O.I.P.» 2000:379-95.
- 52 Gallo O, Boddi V, Calzolari A, Simonetti L, Trovati M, Bianchi S. *bcl-2 expression correlates with recurrence and survival in early stage squamous-cell carcinoma of the head and neck treated by radiotherapy.* Clin Cancer Res 1996;2:261-7.
- 53 Gallo O, Chiarelli I, Boddi V, Bocciolini C, Bruschini L, Porfirio B. *Cumulative prognostic value of p53 mutations and bcl-2 protein expression in head and neck cancer treated by radiotherapy.* Int J Cancer 1999;84:573-9.

- 54 Georgiou A, Gomatos IP, Ferekidis E, Syrigos K, Bistola V, Giotakis J, et al. *Prognostic significance of p53, bax and bcl-2 gene expression in patients with laryngeal carcinoma*. Eur J Surg Oncol 2001;27:574-80.
- 55 Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Fountzilias G. *c-erbB-2 oncoprotein is overexpressed in poorly vascularised squamous cell carcinoma of the head and neck, but is not associated with response to cytotoxic therapy or survival*. Anticancer Res 2000;20:997-1004.
- 56 Gluckman JL, Stambrook PJ, Pavelic ZP. *Prognostic significance of p53 protein accumulation in early stage T1 oral cavity cancer*. Eur J Cancer B Oral Oncol 1994;30B:281.
- 57 Gomyo Y, Ikeda M, Osaki M, Tatebe S, Tsujitani S, Ikeguchi M, et al. *Expression of p21 (waf1/cip1/sdi1) but not p53 protein, is a factor in the survival of patients with advanced gastric carcinoma*. Cancer 1997;79:2067-72.
- 58 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.
- 59 Grandis JR, Tweardy DJ. *Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer*. Cancer Res 1993;53:3579-84.
- 60 Grandis JR, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, et al. *Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival*. J Nat Cancer Inst 1998;90:824-32.
- 61 Greider CW, Blackburn EH. *A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis*. Nature 1989;337:331-7.
- 62 Hahn WC, Meyerson M. *Telomerase activation, cellular immortalization and cancer*. Ann Med 2001;33:123-9. Review.
- 63 Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, et al. *Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells*. Nat Med 1999;5:1164-70.
- 64 Hammel P, Boissier B, Chaumette MT, Piedbois P, Rotman N, Kouyoumdjian JC, et al. *Detection and monitoring of serum of p53 antibodies in patients with colorectal cancer*. Gut 1997;40:356-61.
- 65 Harle-Bachor C, Boukamp P. *Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes*. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:6476-81.
- 66 Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. *The p21^{kd} Cdk interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases*. Cell 1993;75:805-16.
- 67 Harper JW. *Cyclin dependent kinase inhibitors*. Cancer Surv 1997;29:91-107.
- 68 Hedge PU, Brenski AC, Caldarelli DD. *Tumor angiogenesis and p53 mutations. Prognosis in head and neck cancer*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1998;124:80-5.
- 69 Heine B, Hummel M, Demel G, Stein H. *Demonstration of constant upregulation of the telomerase RNA component in human gastric carcinomas using in situ hybridization*. J Pathol 1998;185:139-44.
- 70 Hendler FJ, Ozanne BW. *Human squamous cell lung cancers express increased epidermal growth factor receptors*. J Clin Invest 1984;74:647-51.
- 71 Herbert B, Pitts AE, Baker SI, Hamilton SE, Wright WE, Shay JW, et al. *Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death*. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:14276-81.
- 72 Hirvikoski P, Kumpulainen E, Virtaniemi J, Johansson R, Haapasalo H, Marin S, et al. *p53 expression and cell proliferation as prognostic factors in laryngeal squamous cell carcinoma*. J Clin Oncol 1997;15:3111-20.
- 73 Hirvikoski P, Kumpulainen E, Virtaniemi J, Pirinen R, Salmi L, Halonen P, et al. *Enhanced apoptosis correlates with poor survival in patients with laryngeal cancer but not with cell proliferation, bcl-2 or p53 expression*. Eur J Cancer 1999;35:231-7.
- 74 Hiyama T, Yokozaki H, Kitadai Y, Haruma K, Yasui W, Kajiyama G, et al. *Overexpression of human telomerase RNA is an early event in oesophageal carcinogenesis*. Virchows Arch 1999;434:483-7.
- 75 Hohauser S, Cavallo S, Bellacosa A, Genuardi M, Galli J, Cadoni G, et al. *Telomerase activity in human laryngeal squamous cell carcinomas*. Clin Cancer Res 1996;2:1895-900.
- 76 Holt SE, Shay JW. *Role of telomerase in cellular proliferation and cancer*. J Cell Physiol 1999;180:10-8. Review.

- 77 Hotz MA, Bosq J, Zbaeren P, Reed J, Schwab G, Krajewski S, et al. *Spontaneous apoptosis and the expression of p53 and Bcl-2 family proteins in locally advanced head and neck cancer*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1999;125:417-22.
- 78 Hou L, Shi D, Tu SM, Zhang HZ, Hung MC, Ling D. *Oral cancer progression and c-erbB-2/neu proto-oncogene expression*. Cancer Lett 1992;65:215-20.
- 79 Houbiers JG, van der Burg SH, van de Watering LM, Tollenaar RA, Brand A, van de Velde CJ, et al. *Antibodies against p53 are associated with poor prognosis of colorectal carcinoma*. Br J Cancer 1995;72:637-41.
- 80 Humphrey PA, Zhu X, Zarnegar R, Swanson PE, Ratliff TL, Vollmer RT, et al. *Hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) in prostatic carcinoma*. Am J Pathol 1995;147:386-96.
- 81 Ishitoya J, Toriyama M, Oguchi N, Kitamura K, Ohshima M, Asano K, et al. *Gene amplification and overexpression of the EGF receptor in squamous cell carcinomas of the head and neck*. Br J Cancer 1989;59:559-62.
- 82 Issing WJ, Wustrow TP, Heppt WJ. *Oncogenes related to head and neck cancer*. Anticancer Res 1993;13:2541-51. Review.
- 83 Jackel MC, Sellmann L, Dorudian MA, Youssef S, Fuzesi L. *Prognostic significance of p53/bcl-2 coexpression in patients with laryngeal squamous cell carcinoma*. Laryngoscope 2000;110:1339-45.
- 84 Jares P, Fernandez PL, Campo E, Nadal A, Bosch F, Aiza G, et al. *PRAD-1/cyclin D1 gene amplification correlates with messenger mRNA overexpression and tumor progression in human laryngeal carcinoma*. Cancer Res 1995;54:4813-7.
- 85 Jeffers M, Schmidt L, Nakaigawa N, Webb CP, Weirich G, Kishida T, et al. *Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer*. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:11445-50.
- 86 Jin YT, Kayser S, Kemp BL, Ordonez NG, Tucker SL, Clayman GL, et al. *The prognostic significance of the biomarkers p21, p53 and bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinoma*. Cancer 1998;82:286-91.
- 87 Jordan RC, Bradley G, Slingerland J. *Reduced levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 in epithelial dysplasia and carcinoma of the oral cavity*. Am J Pathol 1998;152:585-90.
- 88 Kapranos N, Stathopoulos GP, Manolopoulos L, Kokka E, Papadimitriou C, Bibas A, et al. *p53, p21 and p27 protein expression in head and neck cancer: their prognostic significance*. Anticancer Res 2001;21:521-8.
- 89 Kawamata N, Morosetti R, Miller CW, Park D, Spirin KS, Nakamaki T, et al. *Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/Kip1 in human malignancies*. Cancer Res 1995;55:2266-9.
- 90 Kay EW, Walsh CJ, Cassidy M, Curran B, Leader M. *C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation*. J Clin Pathol 1994;47:816-22.
- 91 Kinzler KW, Vogelstein B. *Cancer therapy meets p53*. N Engl J Med 1994;331:49-50.
- 92 Klatka J. *Prognostic value of the expression of p53 and bcl-2 in patients with laryngeal carcinoma*. Eur Arch Otorhinolaryngol 2001;258:537-41.
- 93 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.
- 94 Kokoska MS, Piccirillo JF, el-Mofty SK, Emami B, Haughey BH, Schoinick SB. *Prognostic significance of clinical factors and p53 expression in patients with glottic carcinoma treated with radiation therapy*. Cancer 1996;78:1693-700.
- 95 Komiya T, Hosono Y, Hirashima T, Masuda N, Yasumitsu T, Nakagawa K, et al. *p21 expression as a predictor for favorable prognosis in squamous cell carcinoma of the lung*. Clin Cancer Res 1997;3:1831-5.
- 96 Kress M, May E, Cassingena R, May P. *Simian virus 40-transformed cell express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 serum*. J Virology 1979;31:472-83.
- 97 Kressner U, Glimelius B, Bergstrom R, Pahlman L, Larsson A, Lindmark G. *Increased serum p53 antibodies level indicate poor prognosis in patients with colorectal cancer*. Br J Cancer 1998;77:1848-51.
- 98 Kropveld A, Slootweg PJ, van Mansfeld AD, Blankenstein MA, Hordijk GJ. *Radioresistance and p53 status of T2 laryngeal carcinoma. Analysis by immunohistochemistry and denaturing gradient gel electrophoresis*. Cancer 1996;78:991-7.
- 99 Kuo MY, Lin CY, Hahn LJ, Cheng SJ, Chiang CP. *Expression of cyclin D1 is correlated with poor*

- prognosis in patients with areca quid chewing-related oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *Oral Pathol Med* 1999;28:165-9.
- 100 Kuo MY, Hsu HY, Kok SH, Kuo RC, Yang H, Hahn LJ, et al. *Prognostic role of p27(Kip1) expression in oral squamous cell carcinoma in Taiwan*. *Oral Oncol* 2002;38:172-8.
- 101 Kyomoto R, Kumazawa H, Toda Y, Sakaida N, Okamura A, Iwanaga M, et al. *Cyclin D1- gene amplification is a more potent prognostic factor than its protein over-expression in human head and neck squamous cell carcinomas*. *Int J Cancer* 1997;74:576-81.
- 102 Lavertu P, Adelstein DJ, Myles J, Secic M. *P53 and Ki-67 as outcome predictors for advanced squamous cell cancers of the head and neck treated with chemoradiotherapy*. *Laryngoscope* 2001;111:1878-92.
- 103 Lenner P, Wiklund F, Emdin SO, Arnerlov C, Eklund C, Hallmans G, et al. *Serum antibodies against p53 in relation to cancer risk and prognosis in breast cancer: a population-based epidemiological study*. *Br J Cancer* 1999;79:927-32.
- 104 Lera J, Lara PC, Perez S. *Tumor proliferation, p53 expression, and apoptosis in laryngeal carcinoma. Relation to the results of radiotherapy*. *Cancer* 1998;83:2493-501.
- 105 Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, et al. *Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas*. *Nat Med* 1997;3:231-4.
- 106 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.
- 107 Luo JC, Neugut AI, Garbowski G, Forde KA, Treat M, Smith S, et al. *Levels of p53 antigen in the plasma of patients with adenomas and carcinomas of the colon*. *Cancer Lett* 1995;91:235-40.
- 108 Maehara Y, Kakeji Y, Watanabe A, Baba H, Kusumoto H, Kohnoe S, et al. *Clinical implications of serum anti p53 antibodies for patients with gastric carcinoma*. *Cancer* 1999;85:302-8.
- 109 Maestro R, Gasparotto D, Vukosavljevic T, Barzan L, Sulfaro S, Boiocchi M. *Three discrete regions of deletion at 3p in head and neck cancers*. *Can Res* 1993;53:5775-9.
- 110 Malumbres M, Barbacid M. *To cycle or nor to cycle: a critical decision in cancer*. *Nat Rev Cancer* 2001;1:222-31.
- 111 Masuda M, Hirakawa N, Nakashima T, Kuratomi Y, Komiyama S. *Cyclin D1 overexpression in primary hypopharyngeal carcinomas*. *Cancer* 1996;78:390-5.
- 112 Matsushima H, Sasaki T, Goto T, Hosaka Y, Homma Y, Kitamura T, et al. *Immunohistochemical study of p21 WAF1 and p53 proteins in prostatic cancer and their prognostic significance*. *Human Pathol* 1998;29:778-83.
- 113 Maurizi M, Scambia G, Benedetti Panici P, Ferrandina G, Almadori G, Paludetti G, et al. *EGF receptor expression in primary laryngeal cancer: correlation with clinico-pathological features and prognostic significance*. *Int J Cancer* 1992;52:862-6.
- 114 Maurizi M, Almadori G, Ferrandina G, Distefano M, Romanini ME, Cadoni G, et al. *Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma*. *Br J Cancer* 1996;74:1253-7.
- 115 Maurizi M, Almadori G, Cadoni G, Scambia G, Ottaviani F, Ferrandina G, et al. *Cathepsin D concentration in primary laryngeal cancer: correlation with clinico-pathological parameters, EGFR status and prognosis*. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1996;69:105-9.
- 116 Maurizi M, Almadori G, Cadoni G, Hohaus S, Cavallo S, Genuardi M, et al. *Telomerase activity in human laryngeal squamous cell carcinomas*. In: Mc Cafferthy G, Coman W, Carrol, eds. XVI World Congress ORL Head and Neck surgery. Monduzzi Editore 1997:569-73.
- 117 Meredith SD, Levine PA, Burns JA, Gaffey MJ, Boyd JC, Weiss LM, et al. *Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. Association with poor prognosis*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;121:790-4.
- 118 Michalides R, van Veelen N, Hart A, Loftus B, Wientjens E, Balm A. *Overexpression of cyclin D1 correlates with recurrence in a group of forty-seven operable squamous cell carcinomas of the head and neck*. *Cancer Res* 1995;55:975-8.
- 119 Michalides RJ, van Veelen NM, Kristel PM, Hart AA, Loftus BM, Hilgers FJ, et al. *Overexpression of cyclin D1 indicates a poor prognosis in squamous cell carcinoma of head and neck*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:497-502.
- 120 Mineta H, Borg A, Dictor M, Wahlberg P, Wennerberg J. *Correlation between p53 mutation and*

- cyclin D1 amplification in head and neck squamous cell carcinomas*. Oral Oncol 1997;33:42-6.
- 121 Mineta H, Miura K, Suzuki I, Takebayashi S, Amano H, Araki K, et al. *Low p27 expression correlates with poor prognosis for patients with oral tongue squamous cell carcinoma*. Cancer 1999;85:1011-7.
- 122 Mori M, Mimori K, Shiraiishi T, Tanaka S, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T. *p27 expression and gastric carcinoma*. Nat Med 1997;3:593(letter).
- 123 Mudenda B, Green JA, Green B, Jenkins JR, Robertson L, Tarunina M, et al. *The relationship between serum p53 autoantibodies and characteristics of human cancer*. Br J Cancer 1994;69:1115-9.
- 124 Muller D, Millon R, Lidereau R, Engelmann A, Bronner G, Flesch H, et al. *Frequent amplification of 11q13 DNA markers is associated with lymph node involvement in human head and neck squamous cell carcinomas*. Oral Oncol Eur J Cancer 1994;30:113-20.
- 125 Munck-Wikland E, Kuylenstierna R, Lindholm J, Auer G. *P53 immunostaining and image cytometry DNA analysis in precancerous and cancerous epithelial lesions of the larynx*. Head Neck 1997;19:107-15.
- 126 Nadal A, Campo E, Pinto J, Mallofre C, Palacin A, Arias C, et al. *P53 expression in normal, dysplastic and neoplastic laryngeal epithelium. Absence of a correlation with prognostic factors*. J Pathol 1995;175:181-8.
- 127 Nakashima T, Wang XF, Masuda M, Inokuchi A, Komiyama S. *Overexpression of p53 nuclear protein in premalignant and malignant lesion*. Eur Otorhinolaryngol 1999;256:56-9.
- 128 Namazie A, Alavi S, Olopade OI, Pauletti G, Aghamohammadi N, Aghamohammadi M, et al. *Cyclin D1 amplification and p16(MTS1/CDK4I) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors*. Laryngoscope 2002;112:472-81.
- 129 Narayana A, Vaughan AT, Gunaratne S, Kathuria S, Walter SA, Reddy SP. *Is p53 an independent prognostic factor in patients with laryngeal carcinoma?* Cancer 1998;82:286-91.
- 130 Narayana A, Vaughan AT, Kathuria S, Fisher SG, Walter SA, Reddy SP. *p53 overexpression is associated with bulky tumor and poor local control in T1 glottic cancer*. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2000;46:21-6.
- 131 Nathan CA, Sanders K, Abreo FW, Nassar R, Glass J. *Correlation of p53 and the proto-oncogene EIF4E in larynx cancers: prognostic implications*. Cancer Res 2000;60:3599-604.
- 132 Nawroz H, van der Riet P, Hruban RH, Koch W, Ruppert JM, Sidransky D. *Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer Res 1994;54:1152-5.
- 133 Neal De Marsh C, Bennett MK. *Epidermal growth factor receptors in human bladder cancer. Comparison of invasive and superficial tumors*. Lancet 1991;1:366-8.
- 134 Nogueira CP, Dolan RW, Gooley J, Byahatti S, Vaughan CW, Fuleihan NS, et al. *Inactivation of p53 and amplification of cyclin D1 correlate with clinical outcome in head and neck cancer*. Laryngoscope 1998;108:345-50.
- 135 Nylander K, Schildt EB, Eriksson M, Roos G. *PCNA, Ki-67, p53, bcl-2 and prognosis in intraoral squamous cell carcinoma of the head and neck*. Anal Cell Pathol 1997;14:101-10.
- 136 Obata A, Eura M, Sasaki J, Saya H, Chikamatsu K, Tada M, et al. *Clinical significance of p53 functional loss in squamous cell carcinoma of the oropharynx*. Int J Cancer 2000;89:187-93.
- 137 Ogoshi M, Le T, Shay JW, Taylor RS. *In situ hybridization analysis of the expression of human telomerase RNA in normal and pathologic conditions of the skin*. J Invest Dermatol 1998;110:818-23.
- 138 Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death*. Cell 1993;74:609-19.
- 139 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.
- 140 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 J Radiat Oncol Biol Phys 1998;42:43(abstract).
- 141 Ozawa S, Ueda M, Ando N, Shimizu N, Abe O. *Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in esophageal squamous cell carcinomas*. Cancer 1989;63:2169-73.
- 142 Pai HH, Rochon L, Clark B, Black M, Shenouda G. *Overexpression of p53 protein does not pre-*

- dict local regional control or survival in patients with early-stage squamous cell carcinoma of the glottic larynx treated with radiotherapy.* Int J Radiat Oncol Biol Phys 1998;41:37-42.
- 143 Peyrat JP, Bonnetterre J, Lubin R, Vanlemmens L, Fournier J, Soussi T. *Prognostic significance of circulating p53 antibodies in patients undergoing surgery for locoregional breast cancer.* Lancet 1995;345:621-2.
- 144 Pignataro L, Pruneri G, Carboni N, Capaccio P, Cesana BM, Neri A, et al. *Clinical relevance of cyclin D1 overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma.* J Clin Oncol 1998;9:3069-77.
- 145 Poljak M, Gale N, Kambic V, Ferluga D, Fischinger J. *Overexpression of p53 gene protein in benign and malignant laryngeal epithelial lesions.* Anticancer Res 1996;16:1947-51.
- 146 Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, et al. *p27 Kip1, a cyclin-CDK inhibitor, links transforming growth factor-beta and ctsct inhibition to cell cycle arrest.* Genes Dev 1994;8:9-22.
- 147 Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, et al. *Cloning of p27 Kip1 a cyclin dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals.* Cell 1994;78:59-66.
- 148 Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, Gatti LA, Firpo EJ, et al. *Expression of the cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients.* Nat Med 1997;3:222-5.
- 149 Portugal LG, Goldenberg JD, Wenig BL, Ferrer KT, Nodzenski E, Sabnani JB, et al. *Human papillomavirus expression and p53 gene mutations in squamous cell carcinoma.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1997;123:1230-4.
- 150 Pruneri G, Pignataro L, Fracchiolla NS, Ferrero S, Capaccio P, Carboni N, et al. *p53 protein expression in laryngeal squamous cell carcinomas bearing wild type and mutated p53 gene.* Histo-pathol 1996;28:513-9.
- 151 Pruneri G, Pignataro L, Carboni N, Ronchetti D, Cesana BM, Ottaviani A, et al. *Clinical relevance of p53 and bcl-2 protein overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma.* Int J Cancer 1998;79:263-8.
- 152 Pruneri G, Pignataro L, Carboni N, Buffa R, Di Finizio D, Cesana BM, et al. *Clinical relevance of expression of the CIP/KIP cell-cycle inhibitors p21 and p27 in laryngeal cancer.* J Clin Oncol 1999;17:3150-9.
- 153 Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato JY, Bar-Sagi D, Roussel MF, et al. *Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts.* Genes Dev 1993;7:1559-71.
- 154 Ralhan R, Nath N, Agarwal S, Mathur M, Wasyluk B, Shukla NK. *Circulating p53 antibodies as early marker of oral cancer: correlation with p53 alterations.* Clin Can Res 1998;4:2147-52.
- 155 Ranelletti FO, Almadori G, Rocca B, Ferrandina G, Ciabattini G, Habib A, et al. *Prognostic significance of cyclooxygenase-2 in laryngeal squamous cell carcinoma.* Int J Cancer 2001;95:343-9.
- 156 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.
- 157 Ries JC, Hassfurther E, Steininger H, Kloss FR, Wiltfang J, Girod SC, et al. *Correlation of telomerase activity, clinical prognosis and therapy in oral carcinogenesis.* Anticancer Res 2001;21:1057-63.
- 158 Riva C, Lavielle JP, Brtambilla E. *Differential c-myc, c-jun, c-raf and p53 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck: implication in drug and radioresistance.* Oral Oncol Eur J Cancer 1995;6:384-91.
- 159 Riviere A, Becker J, Loning T. *Comparative investigation of cerbB2/neu expression in head and neck tumors and mammary cancer.* Cancer 1991;67:2142-9.
- 160 Rowley H, Roland NJ, Helliwell TR, Caslin A, Kinsella AR, Jones AS. *p53 protein expression in tumors from the head and neck subsites, larynx and hypopharynx, and differences in relationship to survival.* Otolaryngol 1998;23:57-62.
- 161 Sainsbury JR, Farndon JR, Needham GK, Malcolm AJ, Harris AL. *Epidermal growth factor receptor status as predictor of early recurrence or of death from breast cancer.* Lancet 1987;1:1398-401.
- 162 Salam MA, Croker J, Morris A. *Overexpression of tumor suppressor gene p53 in laryngeal squamous cell carcinomas and its prognostic factor.* Clin Otolaryngol 1995;20:49-52.
- 163 Saunders ME, MacKenzie R, Shipman R, Fransen E, Gilbert R, Jordan RC. *Patterns of p53 gene*

- mutations in head and neck cancer: full-length gene sequencing and results of primary radiotherapy. *Clin Cancer Res* 1999;5:2455-63.
- 164 Scambia G, Benedetti Panici P, Ferrandina G, Battaglia F, Distefano M, D'Andrea G, et al. Significance of epidermal growth factor receptor expression in primary human endometrial cancer. *Int J Cancer* 1994;56:26-30.
- 165 Scambia G, Catozzi L, Benedetti Panici P, Ferrandina G, Almadori G, Paludetti G, et al. Expression of ras oncogene p21 protein in normal and neoplastic laryngeal tissue: correlation with histopathological features and epidermal growth receptors. *Br J Cancer* 1994;69:995-9.
- 166 Sherr CJ. *G1 phase progression: Cycling on cue*. *Cell* 1991;79:501-15.
- 167 Sherr CJ. *Mammalian G1 cyclins*. *Cell* 1993;73:1059-65.
- 168 Sherr CJ. *Cyclin D-type cyclins*. *Trends Biochem Sci* 1995;20:187-90.
- 169 Sherr CJ. *Cancer cell cycles*. *Science* 1996;274:1672-7.
- 170 Shiga H, Rasmussen AA, Johnston PG, Langmacher M, Baylor A, Lee M, et al. Prognostic value of c-erbB2 and other markers in patients treated with chemotherapy for recurrent head and neck cancer. *Head Neck* 2000;22:599-608.
- 171 Shin DM, Lee JS, Lippman SM, Lee JJ, Tu ZN, Choi G, et al. p53 expressions: predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:519-29.
- 172 Sittel C, Eckel H, Damm M. Ki67(MIB1), p53, and Lewis-X(LeuM1) as prognostic factors of recurrence in T1 and T2 laryngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2000;110:1012-7.
- 173 Smith BD, Smith GL, Carter D, DiGiovanna MP, Kasowitz KM, Sasaki CT, et al. Molecular marker expression in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;127:780-5.
- 174 Soussi T. p53 antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res* 2000;60:1777-88.
- 175 Soussi T, Beroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev* 2001;1:233-40.
- 176 Stoll C, Baretton G, Lohrs U. The influence of p53 and associated factors on the outcome of patients with oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 1998;433:427-33.
- 177 Suwa H, Ohshio G, Okada N, Wang Z, Fukumoto M, Imamura T, et al. Clinical significance of serum p53 antigen in patients with pancreatic carcinoma. *Gut* 1997;40:647-53.
- 178 Takes RP, Baatenburg De Jong R, Schuring ED, Litvinov SV, Hermans J, Van Krieken JH. Differences in expression of oncogenes and tumor suppressor genes in different sites of head and neck squamous cell. *Anticancer Res* 1998;18:4793-800.
- 179 Tamura N, Dong Y, Sui L, Tai Y, Sugimoto K, Nagahata S, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is related to cell proliferation and prognosis in laryngeal squamous cell carcinomas. *J Laryngol Otol* 2001;115:400-6.
- 180 Tan LK, Ogden GR. p53 over-expression in laryngeal carcinoma is not predictive of response to radiotherapy. *Oral Oncol* 1997;33:177-81.
- 181 Tanaka N, Ogi K, Odajima T, Dehari H, Yamada S, Kimijima Y, et al. pRb/p130 protein expression is correlated with clinicopathological findings in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 2001;92:2117-25.
- 182 Todd R, Donoff BR, Gertz R, Chang AL, Chow P, Matossian K, et al. TGF and EGF receptor mRNAs in human oral cancers. *Carcinogenesis* 1989;10:1553-6.
- 183 Trask DK, Wolf GT, Bradford CR, Fisher SG, Devaney K, Johnson M, et al. Expression of Bcl-2 family proteins in advanced laryngeal squamous cell carcinoma: correlation with response to chemotherapy and organ preservation. *Laryngoscope* 2002;112:638-44.
- 184 Trivers GE, Cawley HL, DeBenedetti VM, Hollstein M, Marion MJ, Bennett WP, et al. Anti p53 antibodies in sera of workers occupationally exposed to vinyl chloride. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1400-7.
- 185 Vennstrom B, Damm K. The erbA and erbB oncogenes. In: Reddy EP, ed. *The oncogene Handbook*. Amsterdam: Elsevier 1988:25-34.
- 186 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.

- 187 Werkmeister R, Brandt B, Joss U. *Clinical relevance of erbB-1 and -2 oncogenes in oral carcinomas*. Oral Oncology 2000;36:100-5.
- 188 Wilson GD, Grover R, Richman PI, Daley FM, Saunders MI, Dische S. *Bcl-2 expression correlates with favourable outcome in head and neck cancer treated by accelerated radiotherapy*. Anticancer Res 1996;16:2403-8.
- 189 Wilson GD, Richman PI, Dische S, Saunders MI, Robinson B, Daley FM, et al. *p53 status of head and neck cancer: relation to biological characteristics and outcome of radiotherapy*. Br J Cancer 1995;71:1248-52.
- 190 Wilson GD, Saunders MI, Dische S, Richman PI, Daley FM, Bentzen SM. *bcl-2 expression in head and neck cancer: an enigmatic prognostic marker*. Int J Radiation Oncology Biol Phys 2001;49:435-41.
- 191 Winter SF, Minna JD, Johnson BE, Takahashi T, Gazdar AF, Carbone DP. *Development of antibodies against p53 in lung cancer patients appears to be dependent on the type of p53 mutation*. Cancer Res 1992;52:4168-74.
- 192 Wood NB, Kotelnikov V, Caldarelli DD, Hutchinson J, Panje WR, Hegde P, et al. *Mutation of p53 in squamous cell cancer of the head and neck: relationship to tumor cell proliferation*. Laryngoscope 1997;107:827-33.
- 193 Wu CW, Lin YY, Chen GD, Chi CW, Carbone DP, Chen JY. *Serum anti p53 antibodies in gastric adenocarcinoma are associated with poor prognosis, lymph node metastasis and poorly differentiated nuclear grade*. Br J Cancer 1999;80:483-8.
- 194 Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Xiao FY, Johnston DA, Liu AR, et al. *Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members*. Clin Cancer Res 1999;5:4164-74.
- 195 Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Liu AR, Li L, Kiyokawa N, et al. *Strong correlation between c-erbB-2 overexpression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma*. Clinical Cancer Res 1997;3:3-9.
- 196 Xie X, Clausen OP, De Angelis P, Boysen M. *The prognostic value of spontaneous apoptosis, Bax, Bcl-2 and p53 in oral squamous cell carcinoma of the tongue*. Cancer 1999;86:913-20.
- 197 Yu D, Wang SS, Dulski KM, Tsai CM, Nicolson GL, Hung MC. *C-erb B-2/neu overexpression enhances metastatic potential of human lung cancer cells by induction of metastasis associated properties*. Cancer Res 1994;54:3260-6.
- 198 Yuen PW, Lam KY, Choy JT, Ho WK, Wei WI. *Clinicopathological significance of p53 and p21 expression in the surgical treatment of laryngeal carcinoma*. Anticancer Res 2000;20:4863-6.
- 199 Yuen PW, Chow V, Choy J, Lam KY, Ho WK, Wei WI. *The clinicopathologic significance of p53 and p21 expression in the surgical management of lingual squamous cell carcinoma*. Am J Clin Pathol 2001;116:240-5.
- 200 Zalcman G, Tredaniel J, Schlichtholz B, Urban T, Milleron B, Lubin R, et al. *Prognostic significance of serum p53 antibodies in patients with limited-stage small cell lung cancer*. Int J Cancer 2000;89:81-6.

VII. IMPATTO DELLA BIOLOGIA MOLECOLARE SULLA SCELTA DELLE STRATEGIE TERAPEUTICHE

L. Pignataro, D. Pagani, E. Arisi, T. Martone*, G. Cortesina*

RUOLO DELLA BIOLOGIA MOLECOLARE NELL'APPROCCIO CHIRURGICO DEL COLLO N0 CLINICO

Oncogeni e metastasi linfonodali

Per i carcinomi spinocellulari della testa e del collo i fattori prognostici generalmente considerati nella pratica clinica sono spesso insufficienti a predire l'evoluzione della malattia sebbene il riscontro di metastasi linfonodale laterocervicale si associ ad una prognosi peggiore con una sopravvivenza ridotta di circa il 50%⁵. È indubbio che la chirurgia su T rappresenti il trattamento maggiormente impiegato nei carcinomi della testa e del collo e particolarmente in quelli a sede laringea, ma risulta altrettanto innegabile che essa offra la soluzione di un solo aspetto poiché permane il problema delle possibili metastasi ai linfonodi che è generalmente riconosciuto essere il fattore prognostico più importante; è noto, infatti, che la diffusione di queste neoplasie avvenga quasi esclusivamente per via linfatica e dia origine ad una localizzazione metastatica dei linfonodi tributari della sede della neoplasia¹⁰⁸.

Una della cause del fallimento terapeutico sembra ascrivibile alla mancanza di radicalità oncologica sulle stazioni linfatiche cervicali^{115 116} anche quando l'analisi istopatologica sembrerebbe confermare l'assenza di cellule neoplastiche. A supporto di questi dati si riporta come piccoli foci di cellule metastatiche (micrometastasi) siano spesso non riscontrati nei linfonodi locoregionali analizzati^{20 25} con il risultato che il rischio di recidive loco regionali aumenta per un «under-staging» della neoplasia e per una scelta terapeutica conseguentemente non appropriata in rapporto alla reale stadiazione della neoplasia.

Alla luce delle attuali conoscenze sulla biologia dei tumori e sull'attività delle strutture linfatiche si riconosce a queste ultime la capacità di operare quali sistemi immuno-competenti nell'evoluzione metastatica di un tumore maligno ma non è ancora determinato, nonostante gli sforzi intesi ad individuare elementi bio-umorali capaci di operare come markers di uno stato di allerta immunitaria di un organismo ospitante una neoplasia, se nell'iniziale fase critica di un tumore maligno della testa e del collo ci si trovi o meno di fronte alla presenza di metastasi loco regionali. È, in effetti, ancora impossibile stabilire se il linfonodo abbia esercitato sulle cellule tumorali una completa azione di filtro antigenico oppure se tale azione di blocco sia

I Clinica ORL, Ospedale Maggiore Policlinico IRCCS, Università di Milano;

* II Clinica ORL, Università di Torino

stata incompleta così che la cellula neoplastica sia rimasta «congelata» nell'interno del linfonodo, ma sempre potenzialmente evolutiva, oppure ancora se l'azione linfonodale sia completamente mancata, rendendo possibile la colonizzazione neoplastica nel parenchima ghiandolare.

Le attuali conoscenze portano ad asserire che l'acquisizione, da parte della cellula neoplastica, della capacità di attraversare le barriere tissutali e quindi di invadere organi e tessuti adiacenti ed a distanza, non sia sostenuta da unico evento cellulare o mutazione genica, bensì da eventi molecolari multipli che portano ad un' incontrollata proliferazione cellulare sostenuta dall'attivazione di alcuni protooncogeni e dall'inattivazione di alcune proteine ad azione oncosoppressiva che favoriscono la selezione di cellule neoplastiche particolarmente aggressive. Questo complesso meccanismo è caratterizzato da diverse fasi che si succedono e si sovrappongono: la proliferazione e l'invasione di strutture circostanti è sostenuta dall'alterazione di alcune proteine di membrana che, in condizioni di normalità favoriscono l'adesione della cellula neoplastica alla membrana basale, dall'attivazione di enzimi proteolitici, dalla stimolazione di fattori mitogenici cellulari e dall'angiogenesi. Se da un lato gli Autori concordano nell'attuare uno svuotamento delle stazioni linfatiche del collo in caso di metastasi linfonodale, dall'altro, l'asportazione precauzionale sistematica del sistema linfonodale cervicale nei casi N0 è ancora oggetto di discussione. Il problema principale è rappresentato dalla detezione delle metastasi linfonodali subcliniche: infatti, la controversia è se sia preferibile l'opzione radioterapica, che è in genere seguita da coloro che ne prevedono il suo impiego come primo presidio contro la neoplasia primitiva, comprendendo nei campi di irradiazione il tumore e le catene linfatiche satelliti⁴, oppure un trattamento profilattico del collo⁹ o una politica del «wait and see» con trattamento di necessità alla comparsa delle metastasi⁵¹. A riguardo delle opzioni chirurgiche gli interventisti giustificano la loro maggiore aggressività riportando una differenza tra N0 clinici e pN+ dopo svuotamento del collo oscillante tra il 36% ed il 50%¹¹³ con un'incidenza di rottura capsulare (RC+) del 13%; gli attendisti invece supportano la loro linea di comportamento appellandosi all'assoluta mancanza di studi prospettici, validi e statisticamente significativi, che dimostrino differenze tra i risultati terapeutici ottenuti con chirurgia primaria su T e N e quelli ottenuti con il trattamento delle logge latero-cervicali al momento in cui le metastasi linfatiche si manifestano clinicamente.

Dati indicativi e per taluni aspetti intermedi alle due posizioni precedentemente esposte sono desumibili dalla disamina delle esperienze cliniche di quanti utilizzano svuotamenti selettivi del collo basandosi sull'osservazione delle aree linfatiche a maggior rischio metastatico, secondo la sede e l'estensione di T.

Al presente l'individuazione di pazienti a rischio di micrometastasi è ancora affidata a criteri di previsione assai sfumati e le metodiche diagnostiche, seppur migliorate, non permettono di ridurre la percentuale di falsi negativi clinici tanto che diversi pazienti ricevono un trattamento chirurgico sulle stazioni linfatiche del collo evitabile con la conseguenza di un aumento della mortalità e morbilità^{79 95}.

Ad oggi la valutazione e lo sviluppo locoregionale delle metastasi sulla base di parametri clinico patologici rimane inadeguata dato che pazienti con identiche caratteristiche e trattamento possono andare incontro ad un'evoluzione della malattia locoregionale marcatamente differente.

È indubbio che le tecniche diagnostiche generalmente utilizzate siano limitate

perché sono intese a ricercare e individuare solo le manifestazioni macroscopiche e pertanto tardive di una serie di eventi biologici a livello cellulare.

Considerando la parziale inadeguatezza per certi aspetti della stadiazione clinica tradizionale (TNM) e basandosi sull'assunto che la metastasi dipenda strettamente dalle proprietà intrinseche del tumore primario e dalla sua interazione con le strutture circostanti, si sono sviluppate ricerche per determinare la caratterizzazione della neoplasia e stratificare i pazienti sulla base di fattori biologici e molecolari capaci, a parità di stadiazione clinica, di identificare tumori maggiormente aggressivi con maggiore propensione a metastatizzare ai linfonodali laterocervicali e come tali suscettibili di un trattamento chirurgico più aggressivo o di scelte terapeutiche complementari.

Il processo di metastatizzazione rappresenta un complesso fenomeno a più fasi condizionato non solo da fattori intrinseci al tumore ma anche dipendenti dall'ospite tanto che le cellule potenzialmente capaci di metastatizzare si caratterizzano per un fenotipo del tutto peculiare⁹⁷. Alcuni^{55 92} riferiscono che la comparsa di metastasi linfonodale sia condizionata da prodotti cellulari di digestione tissutale come le collagenasi o altre metalloproteinasi, altri riportano attraverso studi riguardanti le molecole d'adesione come la metastasi linfonodale sia condizionata dal tumore capace di rilasciare emboli neoplastici per ridotta adesività intercellulare⁹⁴.

In questi ultimi anni le ricerche di diversi gruppi hanno portato ad un notevole miglioramento delle conoscenze dei complessi meccanismi di crescita neoplastica fornendo nuovi modelli molecolari per selezionare precocemente tumori più aggressivi tanto da poter sospettare la presenza di metastasi subcliniche od escluderle in base alle caratteristiche molecolari del tumore primitivo.

L'approccio più recente e moderno alla metastatizzazione nasce pertanto dallo studio di marcatori genetici, oncogeni e oncosoppressori che una volta attivati potrebbero conferire alla cellula neoplastica una maggiore potenzialità metastatica. In particolare l'analisi genetica verte sullo studio di alterazioni a carico di geni mappati in regioni cromosomiche più o meno estese generalmente localizzate in aree cromosomiche quali 17p, 11p, 9p, 3p, 10q, e 13q^{1 59 61 73}.

Dai vari studi emerge come diversi marker molecolari possano essere associati a forme tumorali più aggressive caratterizzate da cellule dotate di un maggior potenziale invasivo e come tali capaci di determinare metastatizzazione ai linfonodi tributari. In particolare si riportano dati riguardanti la regione 11q13, il gene oncosoppressore p53, il gene bcl-2.

Dall'analisi di quanto riportato sulla ciclina D1 nel carcinoma della testa e del collo si evince come diversi autori riportano una correlazione tra questo gene e la presenza di metastasi linfonodali^{2 6 15 24 49 63 68 70 82}.

Quattro lavori a nostra conoscenza riportano dati statisticamente rilevanti dopo un'analisi di casistiche sufficientemente ampie: Muller et al. (1994)⁷⁰ su 178 casi di carcinoma della testa e del collo riscontrano una amplificazione della regione 11q13 nel 57% dei casi, in particolare dell'hst-1/FGF4 e di bcl-1 significativamente associata con la presenza di metastasi linfonodale ($p = 0,001$). In particolare era riscontrabile una amplificazione di questi geni nel 65% dei casi pari a 87 casi N+ su 135 rispetto ad una percentuale del 35% nei casi N0 (13 su 37). In ricerche personali, (1998)⁸² riportiamo su una casistica selezionata di 149 casi di carcinoma della laringe, una correlazione statisticamente significativa tra sovraespressione di ciclina

D1, riscontrabile su campioni di tumore, e presenza di metastasi linfonodale ($p = 0,014$) in quanto una positività per la ciclina D1 era riscontrabile nel 45,8% dei casi N+ vs un 25,7% dei casi No in linea con quanto riportato su 102 campioni di carcinoma della laringe da Dong et al. (2001)²⁴. Infine Michalides et al. (1997)⁶⁸ riportano una significatività statistica tra sovraespressione e casi pari ad un $p = 0,04$.

S'intende inoltre sottolineare che come per altri oncogeni, sottosedi specifiche possano più di altre essere considerate maggiormente aggressive; infatti, Masuda et al. (2000)⁶⁴ riportano una percentuale di sovraespressione maggiore rispetto a quanto riscontrato da altri autori e una correlazione statisticamente significativa tra sovraespressione di ciclina D1 e metastasi linfonodale ($p = 0,037$) per carcinomi a sede ipofaringea.

Riguardo il gene oncosoppressore p53 e il gene bcl-2 i dati della letteratura sono particolarmente esigui.

Per il primo, il nostro gruppo⁸⁴ riporta una correlazione statisticamente significativa tra p53 e presenza di metastasi linfonodali ($p = 0,016$); Yuen et al. (2000)¹²³ evidenziano in campioni di carcinomi laringei una significatività, mantenuta anche all'analisi multivariata, tra espressione di p53 ed interessamento linfonodale ($p = 0,049$); in particolare l'incidenza di metastasi laterocervicali era del 44% nei pazienti con alterazione di p53 rispetto ad un 30% nei pazienti con p53 normale.

Per bcl-2, Jackel et al. (2000)⁴⁸ riportano, su 88 pazienti con carcinoma della laringe, una correlazione statisticamente significativa tra espressione di bcl-2 e metastasi linfonodali ($p = 0,0002$) ed in particolare l'autore evidenzia come tutti i casi bcl-2 negativi erano N0. Pruneri et al.⁸⁴ riportano su 149 casi di carcinoma laringeo dati in linea con Jackel dimostrando una correlazione statisticamente significativa tra questo gene e la presenza di metastasi ($p = 0,001$), in particolare, dimostra una più alta percentuale di casi bcl-2 negativi in pazienti senza interessamento linfonodale. Infine, Wilson (2001)¹²¹, su una ampia casistica di carcinomi della testa e del collo comprendenti casi N0, N1, N2 e N3, riporta una significatività per bcl-2 all'analisi multivariata e afferma che la percentuale di positività cresce dal 9,5% a valori più alti (range 16,2%-26,6%) nei casi N+.

Correlazioni tra presenza di metastasi linfonodali ed altri geni sono riportate da alcuni autori, tuttavia i dati sono particolarmente limitati se consideriamo casistiche di una certa rilevanza numerica. Tra questi, Maurizi et al. (1996)⁶⁷, su 140 casi di carcinoma laringeo, evidenziano una correlazione significativa tra il gene EGFR ed il rischio di metastasi laterocervicali all'analisi univariata riscontrando, inoltre, all'analisi multivariata a 5 anni una sopravvivenza libera da metastasi (MFS) nel 66% dei pazienti EGFR negativi rispetto al 15% per i pazienti EGFR positivi. Infine, Tanaka et al. (2001)¹⁰⁹ riportano su 122 pazienti con carcinoma della cavità orale una correlazione statistica tra pRb2/p130 e presenza di metastasi ($p = 0,035$).

Alterazioni oncogeniche e metastatizzazione occulta

Attualmente l'individuazione di pazienti a rischio di micrometastasi è ancora affidata a criteri di previsione assai sfumati. Le metodiche diagnostiche, seppur migliorate, non permettono di ridurre la percentuale di falsi negativi clinici tanto che diversi pazienti ricevono un trattamento chirurgico sulle stazioni linfatiche del collo evitabile con la conseguenza di un aumento della mortalità e morbilità^{65 94 102}. In

letteratura si riporta che un 7-10% di metastasi linfonodali è riscontrato unicamente all'esame istopatologico^{26 112} tanto che il trattamento di un collo clinicamente N0 risulta ampiamente dibattuto. Alla luce di queste considerazioni sono stati attuati studi per una valutazione di una possibile correlazione tra alterazione molecolare e metastasi occulta.

In ricerche personali¹⁶ su pazienti affetti da carcinoma della testa e collo (tutti casi N0) abbiamo riscontrato una correlazione statisticamente significativa tra sovraespressione di ciclina D1 e metastasi linfonodale occulta (pN+) sia all'analisi univariata che multivariata ($p = 0,0007$ e $p = 0,0059$ rispettivamente) tanto da considerare questo gene un fattore prognostico indipendente per metastatizzazione occulta.

Franchi et al. (1996)²⁶ rilevano in pazienti affetti da carcinoma squamocellulare della laringe una significativa perdita di espressione di caderina E ed un aumento significativo di espressione di PCNA e MIB-1 nei carcinomi con metastasi occulte rispetto ai casi pN0 tanto da considerare questi indici fattori predittivi indipendenti di metastatizzazione occulta e parametri utili nell'identificare sottogruppi di pazienti che potrebbero beneficiare di un trattamento profilattico di svuotamento laterocervicale.

Riguardo all'oncogene MET, Di Renzo et al. (2000)²² riscontrano in 46 su 117 linfonodi laterocervicali esaminati, una sovraespressione di questo gene, che normalmente non risulta in linfonodi negativi per metastasi. La successiva analisi quantitativa della percentuale di alleli mutanti presenti, rispettivamente nel tumore e nelle metastasi, ha dimostrato che solo un piccolo numero di cellule, nella massa del tumore primitivo, esprimono la forma mutata di MET ed il numero di cellule con la forma mutata di MET è maggiore nelle metastasi linfonodali. Tali dati, nell'insieme, suggeriscono che le mutazioni puntiformi di MET non sono eventi frequenti, ma quelle rare cellule presenti nel tumore primario che hanno la mutazione di MET, hanno un vantaggio selettivo nella progressione neoplastica. Tale riscontro porta ad ipotizzare che alterazioni dell'oncogene MET potrebbero favorire una maggior suscettibilità allo sviluppo di metastasi tanto da considerare questo gene uno specifico marcatore di micrometastasi in tumori di derivazione epiteliale, essendo specifico del tessuto da cui il tumore origina e non essendo espresso in modo quantitativamente significativo nelle cellule del sistema emato-linfopoietico.

Per ultimo, ma non per importanza intendiamo sottolineare quanto riportato da Masuda (2000)⁶⁴ su una casistica relativamente esigua di carcinomi della lingua. L'autore sottolinea come il gruppo di pazienti con metastasi laterocervicali tardive presentava una bassa espressione della molecola di adesione (CD44H) ipotizzando che la down regolazione di questo marcatore potrebbe essere correlata alla presenza di micrometastasi occulte ($p = 0,0035$).

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Il dato attuale più sicuro è rappresentato dal fatto, ormai comprovato che a N0 clinico corrisponde un pN+ in una percentuale di casi superiore al 30%: la giustificazione di indicare uno svuotamento, cervicale profilattico in N0 clinico si basa soprattutto sull'alta probabilità che esistano micrometastasi occulte nei linfonodi, per

le quali non è possibile prevedere se siano «murate vive» nel linfonodo o se siano pronte ad « esplodere ». La ricerca attuale è tutta rivolta a identificare modificazioni molecolari che siano indice di aggressività e quindi predittive di metastatizzazione. Esistono studi condotti con metodo adeguato che dimostrano che l'iperpressione di bcl-1 e di bcl-2 si correla in modo significativo (insieme talora con la co-amplificazione della regione cromosomica 11q13) con la metastatizzazione linfonodale. Lo stesso fenomeno è stato osservato per quanto riguarda EGF-R, mentre dati più incerti ed esigui si hanno per quanto riguarda la p53. Potremo quindi inquadrare queste espressioni molecolari come fattori prognostici sperimentali predittivi per una metastatizzazione linfonodale.

Le basi molecolari per l'identificazione dei tumori radio-chemio-sensibili

Il trattamento chemio-radioterapico è per il clinico un'opzione terapeutica adottata per i carcinomi squamocellulari della testa e del collo in stadio avanzato qualora il paziente non sia eleggibile al trattamento chirurgico oppure si vogliono evitare importanti sequele anatomiche funzionali. In particolare per le neoplasie della laringe e della faringe si sono sviluppati sempre di più trattamenti chemio-radioterapici che permettono di ottenere nella maggior parte dei casi con la preservazione d'organo risultati comparabili con quelli di pazienti sottoposti invece a trattamento chirurgico e radioterapia post-operatoria ⁷⁶. Solo il 30% dei pazienti richiedono successivamente una chirurgia di salvataggio ⁸⁰.

A tutt'oggi nella maggior parte dei casi la scelta terapeutica, sia essa chirurgica o chemio-radioterapica è ancora definita sulla base di criteri clinici (stadiazione, sede e tipo macroscopico del tumore, ecc.) ⁸⁴³ di per sé poco attendibili: è, infatti, noto che spesso alcuni pazienti non rispondono in maniera efficace alla terapia e che la risposta di neoplasie in stadio apparentemente uguale possa essere alquanto discordante.

Alla luce di queste considerazioni negli ultimi anni si sono sviluppati studi mirati a ricercare parametri differenti sia di tipo biologico che molecolare capaci di predire la risposta del tumore al trattamento chemioterapico e radiante per cercare di selezionare, da una parte, pazienti da sottoporre a questi trattamenti con una riduzione di morbilità, di costi e dall'altra, indirizzarne altri precocemente ad una scelta chirurgica.

È noto che la radioterapia e la chemioterapia inducono un danno a carico del DNA determinando apoptosi, meccanismo che richiede l'attivazione di funzioni genetiche complesse a tutt'oggi non ancora completamente definite. Negli ultimi anni sempre maggiori evidenze indicano che alcuni geni possono favorire (geni pro-apoptotici) od inibire (geni anti-apoptotici) l'apoptosi tanto che il fallimento radio o chemioterapico può essere attribuito ad una individuale intrinseca resistenza della cellula neoplastica.

Parametri biologici di radiochemiosensibilità

DNA ploidia: rappresenta un indice indiretto del grado di aberrazione delle cellule neoplastiche. La transizione di una popolazione tumorale dallo stato diploide allo stato aneuploide è un processo dinamico legato all'instabilità genomica conseguente ad alterazioni del controllo replicativo e dei meccanismi riparativi del DNA.

Secondo la maggior parte degli Autori neoplasie caratterizzate da componenti cellulari aneuploidi sembrerebbero essere maggiormente radiosensibili essendo meno efficienti i meccanismi di riparazione del danno radio indotto nel DNA pur se questi tumori sono caratterizzati generalmente da elementi cellulari a maggior attività replicativa^{29 38 39 104 111}. Alla luce di queste considerazioni per i carcinomi della testa e del collo, pertanto, la quantificazione del contenuto di DNA (definito come ploidia o DNA index) è stato proposto quale parametro obbiettivo per selezionare cellule neoplastiche con particolari caratteristiche in grado di determinare, in caso di anomalo contenuto di DNA, una prognosi sfavorevole.

Ossigenazione del tumore. L'ossigenazione di un tessuto neoplastico rappresenta un indice di notevole importanza nel definire la radiosensibilità di un tumore dato che l'ipossia si correla ad una ridotta od addirittura assente attività replicativa cellulare; a riguardo Nordmark et al. (2000)⁷⁴ hanno misurato la pO_2 in 321 pazienti affetti da carcinoma spinocellulare della testa e del collo in stadio III e IV; evidenziando una correlazione statisticamente significativa tra frazione di pO_2 minore di 2,5 e 5 mmHg e ridotta sopravvivenza assoluta a 3 anni ($p = 0,005$ e $p = 0,004$ rispettivamente); tale parametro manteneva inoltre significatività statistica alla analisi multivariata.

Radiosensibilità intrinseca. La risposta al trattamento radiante è notoriamente influenzata dalla percentuale di cellule neoplastiche resistenti. Emerge pertanto l'importanza di prevedere la percentuale di cellule in grado di sopravvivere alla dose radiante: il test apparentemente più valido è basato sulla misurazione del SF2 (tumor surviving fraction a 2 Gy) che valuta in vitro su un campione bioptico di tumore prelevato a fresco e coltivato in agar la proporzione di cellule in grado di sopravvivere e replicarsi per 6 cicli mitotici dopo esposizione ad una dose radiante di 2 Gy^{7 12}.

Dati contrastanti emergono a riguardo di altri parametri quali Ki67, tptot e fattori di interazione tra tumore e stroma. In particolare tra questi sembra importante sottolineare i dati preliminari riportati sul ruolo di mediatori delle caderine, integrine e laminine che sembrerebbero rappresentare fattori capaci di influenzare la crescita e la ripopolazione di cellule sottoposte a radioterapia⁹¹.

Parametri molecolari

Dall'analisi critica dei dati riportati in letteratura emerge come diversi markers molecolari possono essere coinvolti nei meccanismi di radio chemiosensibilità e tra questi in particolare: i geni p53, bcl-2 e bax oltre che altri fattori quali angiogenesi, EGFR e Cox -2.

Gene p53. L'osservazione del coinvolgimento del gene p53 nell'arresto del ciclo cellulare in fase G1-S e nell'innescare 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 cellula-

re⁷⁵ e contrastati dall'azione «inibitoria» di oncogeni quali bcl-2, gene capace di inibire l'apoptosi indotta da radioterapia e/o da agenti chemioterapici¹⁰⁵.

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 apoptosi⁶⁰: 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 chemioterapici³⁰.

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 locoregionali che di sopravvivenza a lungo termine.

In particolare Koch et al. (1996)⁵³ 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 locoregionale statisticamente significativa ($p = 0,02$)⁵³, Ganly et al. (2000)³⁴ rilevano nel 95% di pazienti affetti da recidiva di carcinoma della testa e del collo trattata con radioterapia una mutazione di p53, Alsner (2001)³ 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% vs 38% e al 29% vs 54 nei pazienti con p53 mutata. Ravi et al. (2001)⁸⁷ riportano in casi di carcinoma del cavo orale come il rischio di recidive locoregionali risulti raddoppiato nei casi che presentavano una alterazione del gene p53.

Cabelguenne (2000)¹³ evidenzia la presenza di mutazioni di p53 in 72 casi su 106 di carcinomi della testa e del collo e la prevalenza di mutazione di p53 in tumori non responsivi al trattamento attribuendo allo status di questo gene valore predittivo per la risposta alla terapia antineoplastica farmacologica. Warnakulasuriya et al. (2000)¹¹⁸ riscontrano una prognosi peggiore, in termini di sopravvivenza a 5 anni ed a lungo termine, in 111 casi di carcinomi avanzati della testa e del collo, trattati con radioterapia e chemioterapia. Bradford (1999)¹⁰ rileva dopo analisi di pazienti con carcinoma della laringe che l'alterazione del gene p53 risultava un fattore prognostico indipendente: l'espressione di p53, infatti, risultava associata con successo alla preservazione d'organo in 40 dei 54 pazienti p53/positivi (74%) rispetto ad un'incidenza del 52% dei casi p53/negativi ($p = 0,003$). Recentemente Lavertu, Osman, Couture e Pukkila^{18 56 76 85} hanno confermato i dati degli autori precedenti valutando l'espressione di p53.

Il primo riporta come una positività per p53 si associ a recidiva sia di T che locoregionale ($p = 0,003$ e $p = 0,003$ rispettivamente), ad una ridotta sopravvivenza globale ed una minor intervallo libero da malattia ($p = 0,003$; $p = 0,004$ rispettivamente). Questa significatività era inoltre confermata alla analisi multivariata ($p = ,01$ e $p = ,02$). Il secondo, su una casistica selezionata di carcinomi avanzati a sede laringea e faringea, sottoposti a trattamento chemioradioterapico ed analizzati con l'intento di attuare una preservazione d'organo conferisce alla p53 un ruolo prognostico indipendente riscontrando dopo analisi multivariata una prognosi significativamente peggiore nei pazienti con una p53 mutata ($p < 0,01$). Couture riporta

dopo analisi su 304 pazienti con carcinoma della testa e del collo trattati con radioterapia una correlazione significativa dopo analisi multivariata tra sovraespressione di p53 e mancata risposta al trattamento radioterapico ($p = 0,05$) con un rischio di recidiva 15 volte maggiore per i pazienti p53/positivi. Infine Pukkila, analizzando 123 carcinomi della testa e del collo riporta una correlazione statisticamente significativa alla analisi univariata tra alti livelli di espressione di p53 e ridotta sopravvivenza non solo valutando l'espressione a livello nucleare ($p = 0,04$) ma anche citoplasmatico ($p = 0,04$). Secondo l'autore il riscontro di una espressione di p53 citoplasmatica potrebbe essere la somma di reazioni diverse capaci di agire nei complessi meccanismi intra ed intercellulari. Infine, Gallo et al. (1999)³² riportano il valore prognostico cumulativo di p53 mutata e dell'espressione di bcl-2 in 85 casi di carcinoma della testa e del collo trattati con radioterapia, in termini di rischio di insuccesso nel controllo locoregionale della malattia e di sopravvivenza a lungo termine. Gli autori rilevano come, essendo p53 e bcl-2 rispettivamente pro- ed anti-apoptotici, la simultanea espressione di grandi quantità di bcl-2 e l'inattivazione per mutazione di p53 si correla ad un incrementato rischio di recidiva locoregionale. In ricerche personali⁸² è stato osservato in carcinomi squamosi della laringe che l'aumentata espressione di bcl-2 si correla significativamente con la metastatizzazione linfonodale e con una ridotta radio-chemiosensibilità. Al contrario, un iperespressione di p53, si correla con una maggiore radio-chemiosensibilità.

Al contrario, solo alcuni Autori non mostrano alcuna relazione tra l'integrità del gene p53 e la risposta alla terapia antineoplastica^{45 81}, od addirittura rilevano una relazione inversa, sostenendo che i tumori p53 mutati siano caratterizzati da una prognosi migliore. In particolare, Gasparini (1995)³⁵ 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. Temam (2000)¹¹⁰ osserva una miglior sensibilità al chemioterapico nei pazienti p53/negativi ed Hedge (1998)⁴⁴ in 39 pazienti riporta nei casi con una p53 normale (p53 wild type) una completa scomparsa della neoplasia ($p = 0,03$).

Nessuna validità prognostica viene rilevata da altri autori: Lera et al. (1998)⁵⁸ in 57 pazienti, Pai et al. (1998)⁷⁷ e Kokoska et al. (1996)⁵⁴ rispettivamente in 86 e 70 pazienti con carcinoma squamocellulare della laringe e, infine, Riva (1995)⁹⁰ in 42 tumori della testa e del collo.

bcl-2. Il gene bcl-2 è un oncogene mitocondriale con funzione anti-apoptotica in grado di codificare una proteina capace di bloccare la morte cellulare programmata tanto che sembra avere un ruolo importante nel favorire la prevalenza di cloni cellulari neoplastici. Dati riportati in letteratura risultano contrastanti tanto che alcuni riportano un incremento di recidive in pazienti con sovraespressione di bcl-2 trattati con radioterapia mentre altri non confermano questi dati.

I risultati di alcuni autori accanto a dati sperimentali che hanno dimostrato che bcl-2 ostacola l'instaurarsi dell'apoptosi indotta da numerosi insulti genotossici, tra cui radiazioni gamma, avvalorano l'ipotesi che l'espressione di questo gene renda le cellule tumorali resistenti alla radioterapia^{23 96 105}. In particolare Gallo et al. (1996)³¹ dimostrano come l'espressione della proteina codificata da bcl-2 sia associata ad una minor responsività e ad una maggior aggressività neoplastica in carcinomi del-

la testa e del collo in fase iniziale irradiati. Per questi autori, la recidiva ed il rischio di morte era significativamente maggiore nel gruppo bcl-2 positivo rispetto al controllo negativo. In uno studio successivo lo stesso autore³² analizza il gene bcl-2 insieme a p53 e riscontra che i pazienti caratterizzati dalla combinazione di p53 mutata e di bcl-2 positivo (casi p53M/bcl-2+) presentano un aumentato rischio di fallimento del controllo locale di malattia ed una diminuita sopravvivenza a 5 anni.

Dati contrastanti rispetto a quanto sopra riportato sono riferiti da Wilson et al. (1996)¹²² e Gasparini et al. (1995)³⁵. Il primo, in 93 carcinomi della testa e del collo trattati con RT, osserva un miglior controllo locale ed una sopravvivenza maggiore nei pazienti caratterizzati da sovraespressione di bcl-2; il secondo correla la positività per bcl-2 ad un maggior probabilità di remissione completa e la coespressione m-p53-/bcl-2+ ad un prolungamento della sopravvivenza libera da malattia.

Bax. Bax è un gene ad azione pro-apoptotica, antagonista rispetto a bcl-2. Sembra accertato da diversi autori che il meccanismo della morte cellulare programmata sia influenzato dall'equilibrio di questi due geni tanto che l'azione di bax sembra essere neutralizzata quando eterodimerizza con bcl-2⁷⁵. È riportato che la sensibilità cellulare a stimoli apoptotici quali trattamenti radiochemioterapici sia influenzata da un corretto rapporto tra questi due geni. In letteratura viene evidenziato in varie linee cellulari ed in vitro un incremento della sensibilità cellulare ai farmaci in presenza di sovraespressione di bax^{42,52}.

In due interessanti lavori, Sugimoto et al. (1999)¹⁰⁶ e Guo et al. (2000)⁴¹, attraverso la transfezione genetica di bax da cellule normali a cellule di carcinomi squamocellulari resistenti alla chemioterapia in vitro e successivamente in vivo nel topo, evidenziano una significativa aumentata sensibilità delle neoplasie agli agenti antitumorali impiegati (cisplatino nell'esperienza di Sugimoto e raltitrexed e SN-38 in quella di Guo).

TGF- α e EGFR. Wen (1996)¹²⁰ evidenzia dopo analisi di campioni di carcinoma laringeo in stadio iniziale trattati con radioterapia come la comparsa di recidive era significativamente più elevata (57,9%) nei casi TGF- α positivi rispetto ai casi TGF- α negativi che presentavano una percentuale di recidive pari al 10% ($p < 0,01$), significatività presente anche all'analisi multivariata. Inoltre Dassonville (1993)¹⁹ riporta su una casistica di 109 pazienti con carcinoma della testa e del collo una correlazione significativa tra espressione di EGFR ed aumento delle recidive in paziente trattati per la maggior parte con chemioterapici.

Angiogenesi. L'analisi della letteratura ha permesso di identificare correlazioni statisticamente significative tra diversi fattori angiogenetici e sensibilità radiochemioterapica^{36,119}.

Giatromanolakis et al. (1999, 2000)^{36,37} riportano in due pubblicazioni distinte concernenti pazienti affetti da neoplasia a stadio avanzato, trattati con chemio e/o radioterapia, una correlazione prognostica tra grado vascolare e risposta al trattamento complementare; più in dettaglio si osserva all'analisi multivariata un maggior numero di recidive ed una ridotta sopravvivenza per gruppi di pazienti con un grado intermedio di vascolarizzazione. Ravi et al. (2001)⁸⁷ riscontrano su campioni di tumore del cavo orale che presentano una scarsa neovascolarizzazione, analizzata

con l'anticorpo CD34, un incremento del rischio di recidiva statisticamente significativo; Zatterstrom et al. (1995)¹²⁴ riportano una migliore sopravvivenza nei pazienti caratterizzati da una neoplasia ad una più alta densità microvascolare analizzata con anticorpo monoclonale per il fattore VIII. Smith (2001)¹⁰⁰ in pazienti affetti da carcinoma della cavità orale e orofaringei conferisce al VEGF un significato prognostico indipendente riscontrando, all'analisi multivariata, una prognosi infausta per i pazienti caratterizzati da tumori positivi per VEGF ($p \leq 0,001$). Infine Gorski et al. (1999)⁴⁰ e Mauceri et al. (1998)⁶⁶ dimostrano rispettivamente che il blocco dell'espressione per il fattore pro-angiogenetico VEGF e l'associazione di angiostatina e frammento proteolitico del plasminogeno, favoriscono la sensibilità cellulare al trattamento radioterapico.

COX-2. Le cicloossigenasi (COX-1 e COX-2) catalizzano la sintesi di prostaglandine dall'acido arachidonico. L'espressione di COX-2 si determina per l'attivazione da parte di differenti stimoli da parte di citochine, fattori di crescita ed oncogeni; il riscontro di una sua up-regolazione nelle cellule tumorali indica come COX-2 sia coinvolta nei processi di tumorigenesi^{47 83}.

L'importanza dell'espressione di COX-2 è stata ipotizzata osservando un incrementato livello di prostaglandine, prodotte dalla COX, in numerose neoplasie umane ivi comprese quelle della testa e del collo¹⁰⁷; in particolare è stato recentemente riportato che COX-2 è up-regolato nei tumori della testa e del collo sia a livello del mRNA che a livello delle proteine¹⁷.

Gallo et al. (2001)³³, considerando 35 pazienti con carcinoma della testa e del collo, hanno ipotizzato che l'eccessiva produzione di prostaglandine indotta da un'overespressione di COX-2 potesse essere responsabile della crescita e della diffusione tumorale, anche per la sua capacità di stimolare la produzione di fattori pro-angiogenetici quali il VEGF. Gli Autori hanno evidenziato in particolare un incrementato valore di mRNA per la COX-2 nelle cellule tumorali rispetto alla mucosa normale. Milas et al. (1999)⁶⁹, infine, hanno evidenziato come nel topo l'inibizione della COX-2 possa ridurre la capacità angiogenetica di una neoplasia migliorando la risposta del tumore al trattamento radiante.

Infine Ranelletti (2001)⁸⁶ analizzando campioni di carcinoma laringeo evidenzia che i tumori caratterizzati da positività per COX-2 erano inversamente associati con rischio di recidiva e morte ($p = 0,012$ e $p = 0,015$ rispettivamente). Questa significatività statistica si manteneva anche dopo analisi multivariata: i pazienti COX-2/positivi manifestavano una più lunga sopravvivenza ($p = 0,0027$) rispetto ai casi COX-2/negativi e parimenti l'intervallo libero da recidiva locoregionale risultava ridotto nei tumori COX-2/negativi ($p = 0,0012$).

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

È stato dimostrato, negli anni passati, che la DNA ploidia si accompagna ad una maggiore radiosensibilità; lo stesso fatto è stato osservato in caso di iperossigenazione del tumore. Risultati soddisfacenti, nel predire il grado di radiosensibilità, si sono avuti con il test SF2 (tumor surviving fraction a 2 Gy), mentre risultati contrastanti si sono avuti con l'uso del Ki67 e con il t pott.

Per quanto riguarda le evidenze molecolari, 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.

Gli stessi risultati non univoci si sono avuti per bcl-2, per cui però si tende ad affermare che l'espressione di bcl-2 ostacola l'apoptosi indotta dalla radio-chimioterapia, e che quindi rende le cellule tumorali resistenti a questo trattamento. Esiste inoltre qualche evidenza a proposito di Bax e di EGF-R: il primo, avrebbe l'effetto di aumentare la radio-chemiosensibilità, mentre il secondo, avrebbe l'effetto opposto.

Valutazione molecolare dei margini di sezione chirurgica (Minimal Residual Disease)

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 e 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 locale e/o regionale.

A dispetto dei miglioramenti delle terapie, sia chirurgiche che complementari (radio chemioterapia) per i pazienti con carcinoma della testa e del collo, in particolare per quelli con neoplasia a stadio avanzato, la prognosi rimane a tutt'oggi ancora sfavorevole^{46 116}. Per questi una delle cause del fallimento terapeutico sembra ascrivibile alla mancanza di radicalità oncologica o sulla sede primitiva o sulle stazioni linfatiche cervicali^{101 115 116} anche quando al clinico viene confermato dall'anatomo patologo l'assenza di neoplasia sui margini di resezione chirurgica e sui linfonodi laterocervicali.

A supporto di questi dati si riporta come la percentuale di recidive locali possano occorrere anche in presenza di margini istologicamente negativi^{50 114}, come piccole foci di cellule metastatiche (micrometastasi) sono spesso non riscontrati nei linfonodi locoregionali analizzati^{21 25} con il risultato che il rischio di recidive aumenta per un «under-staging» della neoplasia e per una scelta terapeutica conseguentemente non appropriata in rapporto alla reale stadiazione della neoplasia.

Alla luce di queste considerazioni si ritiene necessario una più precisa e 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 digestive²⁷.

Alcune moderne conoscenze riguardanti gli aspetti biologici della carcinogenesi dei tumori solidi rendono certamente più complesso il problema del tessuto considerato sano che il chirurgo non asporta e di conseguenza meno sicuro l'attuale concetto di controllo locale della malattia basato su evidenze cliniche, radiologiche e istologiche tradizionali. Oggi lo studio molecolare dei pazienti affetti da neoplasie multiple della testa e del collo ha permesso di sviluppare ricerche mirate a distinguere se una seconda localizzazione tumorale nelle vie aeree digestive superiori debba essere considerata una seconda neoplasia o una ripresa di malattia con la conseguenza di importanti riflessi terapeutici: infatti, generalmente la condotta nel primo caso ha un intendimento solo palliativo mentre presenta fini di guarigione in caso di una seconda neoplasia.

Le indagini molecolari permettono di evidenziare nei protooncogeni e nei geni oncosoppressori, per l'azione di carcinogeni diversi, delle alterazioni molecolari che si pensa avvengano con un andamento a cascata, multistep, con possibilità di estendersi nello spazio con una susseguente iniziale clonazione di cellule mutate.

È riconosciuto che in un'area esposta ai carcinogeni si possono avere zone in fase diverse e che un'area istologicamente negativa possa essere già sede di un'alterazione genetica: questi dati portano a rivalorizzare un concetto introdotto da Slaughter nel 1946 che è quello della «field cancerization»⁹⁸. L'autore descrive così lo stato di predisposizione delle mucose dei pazienti con carcinoma della testa e del collo ad evolvere verso la trasformazione neoplastica e supporta l'ipotesi che questa predisposizione possa essere geneticamente predeterminata.

Inoltre sottolinea come un fattore di rischio che può promuovere una neoplasia attraverso le varie fasi della carcinogenesi, in un distretto quale una mucosa, è molto probabile che agisca anche in distretti ad essa adiacenti inducendo così focolai di iniziazione e promozione da cui possono originare tumori multipli, metacroni e sincroni⁹⁹. Dati dalla letteratura evidenziano infine che la mucosa di pazienti con carcinomi della testa e del collo rispetto alla mucosa di pazienti normali presenterebbe i segni di una possibile evoluzione neoplastica multifocale caratterizzabile per la presenza di una significativa alta attività di prodotti proteici oncogenici¹¹⁶.

L'impiego sempre più frequente di tecniche di biologia molecolare nello studio delle neoplasie umane ha consentito recentemente di utilizzare metodiche relativamente semplici per l'identificazione in campioni biologici di diversa natura, quali saliva, plasma, ma anche margini di sezione e linfonodi, di un piccolissimo numero di cellule «clonali» con alterazioni del DNA analoghe alle cellule del tumore primitivo, aprendo così la strada ad una stadiazione molecolare della neoplasia stessa.

In letteratura viene riportato il ruolo del gene oncosoppressore p53 come marcatore molecolare nei margini di resezione¹¹ e dimostrata^{62 103 117} la presenza di cloni in cellule tumorali in campioni di plasma, siero, saliva e urina attraverso l'analisi del DNA con l'uso di microsatelliti. Utilizzando questo approccio, Califano et al. (1999)¹⁴ dimostrano come la sede di origine di un carcinoma squamoso della testa e del collo, inizialmente sconosciuta, possa essere diagnosticata con il riconoscimento, in aree di mucosa istologicamente negative, di cellule clonali geneticamen-

te riscontrate nelle metastasi laterocervicali ed asseriscono che la presenza di identiche alterazioni molecolari in campioni istopatologici prelevati ai margini della neoplasia, in linfonodi non metastatici e nel corrispondente tumore primitivo potrebbe essere utilizzato dall'oncologo come marker istopatologico molecolare.

Brennan (1995)¹¹ riporta nel 43% dei margini negativi all'istologia tradizionale una p53 mutata alla PCR con una mutazione identica a quella del tumore primitivo nel 52% dei casi ed una correlazione statisticamente significativa tra p53M, numero di recidive e sopravvivenza¹¹.

Nathan (1997)⁷¹ osserva su campioni di carcinoma della laringe e della testa e del collo che l'iperespressione del protooncogene eIF4E, può indurre trasformazione maligna attivando fattori di crescita dei fibroblasti (FGF2) e fattori angiogenetici (VEGF) e che anch'esso si riscontra in aree di mucosa adiacente al tumore istologicamente negative alle indagini routinarie. Specificatamente l'autore ripetutamente osserva una correlazione significativa tra positività all'eIF4E e recidiva locoregionale^{71 72}; tanto da considerare questo gene un fattore prognostico indipendente ($p < 0,001$). risultati confermati anche da Franklin in campioni di carcinomi laringei e ipofaringei²⁸.

Recentemente Ries JC (2001)⁸⁸ osserva attività telomerasica in aree di mucosa normale di pazienti con carcinoma della cavità orale. Specificatamente il riscontro di attività telomerasica nella aree di mucosa normale nei soli pazienti caratterizzati tutti da un tumore con un'alta attività telomerasica porta ad asserire che in differenti sedi della mucosa orale sono presenti cellule neoplastiche non riscontrabili alle indagini istopatologiche routinarie legate al processo di «field cancerization»⁷⁸.

Alla luce di queste considerazioni dati preliminari ottenuti recentemente da Gallo et al.⁹³ in uno studio retrospettivo, suggeriscono, infatti, la possibilità che l'uso della stadiazione e dell'analisi molecolare dei margini di sezione chirurgica, basato cioè sull'identificazione di una popolazione di cellule genotipicamente correlate con il tumore primitivo e non necessariamente modificate fenotipicamente al punto da non essere facilmente riconoscibili come maligne dall'esame istopatologico, possa consentire l'identificazione di una «minimal residual disease» non altrimenti riconoscibile. La stretta correlazione tra incidenza di recidive nel follow-up e presenza di cellule clonalmente correlate con il tumore primitivo (positività molecolare) in margini di sezione negativi all'esame istopatologico, dimostrata in questo studio, suggerisce pertanto la possibilità, attraverso l'analisi molecolare con microsattelliti, di una migliore stadiazione delle neoplasie ed una re-definizione del concetto di «margine di sezione negativo» nella chirurgia dei carcinomi della testa e del collo così come di molte altre neoplasie solide trattate chirurgicamente⁸⁹.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Il problema della valutazione dei margini di resezione chirurgica con metodo istopatologico tradizionale sarà analizzato in un capitolo successivo (Cap. 11).

Il fatto che siano state descritte un certo numero di recidive locali a margini istopatologicamente negative, ha indotto alcuni autori ad approfondire il problema dal punto di vista molecolare.

Esistono evidenze molto incoraggianti, che possono giustificare l'impiego cli-

nico in centri attrezzati, sul fatto che in margini istologicamente negativi, possono esistere mutazioni del gene p53 identiche a quelle del tumore primitivo e delle metastasi linfonodali, cui si correla aumento di recidive e peggior sopravvivenza.

Ancora troppo preliminari per un impiego clinico, i dati relativi alla positività all'E1F4E in margini istologicamente negativi, che si correlerebbe con un aumento di recidive locali.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Ah-See KW, Cooke TG, Pickford IR, Soutar D, Balmain A. *An allelotype of squamous carcinoma of the head and neck using microsatellite markers*. Cancer Res 1994;54:1617-21.
- ² Akervall JA, Michalides RJAM, Mineta H, Balm A, Borg A, Dictor MR, et al. *Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression*. Cancer 1997;79:380-9.
- ³ Alsner J, Sorensen SB, Overgaard J. *TP53 mutation is related to poor prognosis after radiotherapy, but not surgery, in squamous cell carcinoma of the head and neck*. Radiother Oncol 2001;59:179-85.
- ⁴ Antonelli AR, Nicolai P, Redaelli de Zinis LO, Luzzago F, Moretti R. *Surgery of lymph nodes N1-N3: conservative or radical dissection*. Acta Otorhinolaryngol Ital 1991;11(Suppl 33):69-79.
- ⁵ Batsakis JG. *Tumors of the head and neck*. 2nd Ed. Baltimore, Md: Williams and Wilkins, 1979.
- ⁶ Berenson JR, Yang J, Mickel RA. *Frequent amplification of the bcl-1 locus in head and neck squamous cell carcinomas*. Oncogene 1989;4:1111-6.
- ⁷ Bjork-Eriksson T, West CM, Cvetskovska E, Svensson M, Karlsson E, Magnusson B et al. *The lack of correlation between proliferation (Ki-67, PCNA, LI, Tpot), p53 expression and radiosensitivity for head and neck cancer*. Br J Cancer 1999;80:1440-4.
- ⁸ Blitzer PH, Wang CC, Suit HD. *Blood pressure and hemoglobin concentration: multivariate analysis of local control after irradiation for head and neck cancer*. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1994;10(Suppl 2):98.
- ⁹ Bocca E, Pignataro O et al. *Functional neck dissection. An evaluation and review of 843 cases*. Laryngoscope 1984;94:942-5.
- ¹⁰ 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;121:534-8.
- ¹¹ Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, et al. *Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck*. N Engl J Med 1995;332:712-7.
- ¹² Brown JM, Yu NY, Brown DM, Lee WW. *SR-2508: a 2-nitroimidazole amide which should be superior to misonidazole as a radiosensitizer for clinical use*. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1981;7:695-703.
- ¹³ Cabelguenne 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 Oncol 2000;18:1465-73.
- ¹⁴ Califano J, Westra WH, Koch W, Meininger G, Reed A, Yip L, et al. *Unknown primary head and neck squamous cell carcinoma: molecular identification of the site of origin*. J Natl Cancer Inst 1999;91:599-604.
- ¹⁵ Callender T, el-Naggar AK, Lee MS, Frankenthaler R, Luna MA, Batsakis JG. *PRAD-1 (CCND1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer 1994;74:152-8.
- ¹⁶ Capaccio P, Pruneri G, Carboni N, Pagliari AV, Quatela M, Cesana BM, et al. *Cyclin D1 expression is predictive of occult metastases in head and neck cancer patients with clinically negative cervical lymph nodes*. Head Neck Surg 2000;22:234-40.
- ¹⁷ Chan G, Boyle JO, Yang EK, Zhang F, Sacks PG, Shah JP, et al. *Cyclooxygenase-2 expression is*

- up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck.* Cancer Res 1999;59:991-4.
- 18 Couture C, Raybaud-Diogene H, Tetu B, Bairati I, Murry D, Allard J, et al. *p53 and Ki-67 as markers of radioresistance in head and neck carcinoma.* Cancer 2002;94:713-22.
- 19 Dassonville O, Formento JL, Francoual M, Ramaioli A, Santini J, Schneider, et al. *Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer.* J Clin Oncol 1993;11:1873-8.
- 20 Davidson TM, Nahum AM, Astarita RW. *Microscopic controlled excisions for epidermoid carcinoma of the head and neck.* Otolaryngol Head Neck Surg 1981;89:244-51.
- 21 Davidson TM, Nahum AM, Haghghi P, Astarita RW, Saltzstein SL, Seagren S, et al. *The biology of head and neck cancer. Detection and control by parallel histologic sections.* Arch Otolaryngol 1984;110:193-6.
- 22 Di Renzo MF, Olivero M, Martone T, Maffe A, Maggiora P, Stefani AD, et al. *Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas.* Oncogene 2000;19:1547-55.
- 23 Dole M, Nunez G, Merchant AK, Maybaum J, Rode CK, Bloch CA, et al. *Bcl-2 inhibits chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma.* Cancer Res 1994;54:3253-9.
- 24 Dong Y, Sui L, Sugimoto K, Tai Y, Tokuda M. *Cyclin D1-CDK4 complex, a possible critical factor for cell proliferation and prognosis in laryngeal squamous cell carcinomas.* Int J Cancer 2001;95:209-15.
- 25 Feinmesser R, Freeman JL, Feinmesser M, Noyek A, Mullen JB. *Role of modern imaging in decision making for elective neck dissection.* Head Neck 1992;14:173-6.
- 26 Franchi A, Gallo O, Boddi V, Santucci M. *Prediction of occult neck metastases in laryngeal carcinoma: role of proliferating cell nuclear antigen, MIB-1, and E-cadherin immunohistochemical determination.* Clin Cancer Res 1996;2:1801-8.
- 27 Franco EL, Kowalski LP, Kanda JL. *Risk factors for second cancers of the upper respiratory and digestive systems: a case-control study.* J Clin Epidemiol 1991;44:615-25.
- 28 Franklin S, Pho T, Abreo FW, Nassar R, De Benedetti A, Stucker FJ, et al. *Detection of the proto-oncogene eIF4E in larynx and hypopharynx cancers.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1999;125:177-82.
- 29 Fu KK, Hammon E, Pajak TF. *Flow cytometric quantification of the proliferation associated nuclear antigen p105 DNA content in advanced head and neck cancer: results of RTOG 91-08.* Int J Radiat Oncol Biol Phys 1994;29:661-71.
- 30 Fujiwara T, Grimm EA, Mukhopadhyay T, Zhang WW, Owen-Schaub LB, Roth JA. *Induction of chemosensitivity in human lung cancer cells in vivo by adenovirus-mediated transfer of the wild-type p53 gene.* Cancer Res 1994;54:2287-91.
- 31 Gallo O, Boddi V, Calzolari A, Simonetti L, Trovati M, Bianchi S. *bcl-2 protein expression correlates with recurrence and survival in early stage head and neck cancer treated by radiotherapy.* Clin Cancer Res 1996;2:261-7.
- 32 Gallo O, Chiarelli I, Boddi V, Bocciolini C, Bruschini L, Porfirio B. *Cumulative prognostic value of p53 mutations and bcl-2 protein expression in head-and-neck cancer treated by radiotherapy.* Int J Cancer 1999;84:573-9.
- 33 Gallo O, Franchi A, Magnelli L, Sardi I, Vannacci A, Boddi V, et al. *Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis.* Neoplasia 2001;3:53-61.
- 34 Ganly I, Soutar DS, Brown R, Kaye SB. *p53 alterations in recurrent squamous cell cancer of the head and neck refractory to radiotherapy.* Br J Cancer 2000;82:392-8.
- 35 Gasparini G, Bevilacqua P, Bonoldi E, Testolin A, Galassi A, Verderio P, et al. *Predictive and prognostic markers in a series of patients with head and neck squamous cell invasive carcinoma treated with concurrent chemoradiation therapy.* Clin Cancer Res 1995;1:1375-83.
- 36 Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Georgoulas V, Gatter KC, Harris AL, Fountzilias G. *Angiogenesis vs response after combined chemoradiotherapy of squamous cell head and neck carcinoma.* Int J Cancer 1999;80:810-7.
- 37 Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Fountzilias G. *c-erbB-2 oncoprotein is overexpressed in poorly vascularised squamous cell carcinomas of the head and neck, but is not associated with response to cytotoxic therapy or survival.* Anticancer Res 2000;20:997-1004.

- 38 Goldsmith MM, Cresson DH, Arnold LA, Postma DS, Askin FB, Pillsbury HC. *DNA flow cytometry as a prognostic indicator in head and neck cancer*. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1987;96:307-18.
- 39 Goldsmith MM, Cresson DS, Postma DS, Askin FB, Pillsbury HC. *Significance of ploidy in laryngeal cancer*. *Am J Surg* 1986;152:396-402.
- 40 Gorski DH, Beckett MA, Jaskowiak NT, Calvin DP, Mauceri HJ, Salloum RM, et al. *Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation*. *Cancer Res* 1999;59:3374-8.
- 41 Guo B, Cao S, Toth K, Azrak RG, Rustum YM. *Overexpression of Bax enhances antitumor activity of chemotherapeutic agents in human head and neck squamous cell carcinoma*. *Clin Cancer Res* 2000;6:718-24.
- 42 Guo B, Yin MB, Toth K, Cao S, Azrak RG, Rustum YM. *Dimerization of mitochondrial Bax is associated with increased drug response in Bax-transfected A253 cells*. *Oncol Res* 1999;11:91-9.
- 43 Hall SF, Groome PA, Rothwell D, Dixon PF. *Using the TNM system to predict survival in squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Anticancer Res* 1998;18:4777-8.
- 44 Hedge PU, Brenski AC, Caldarelli DD. *Tumor angiogenesis and p53 mutations. Prognosis in head and neck cancer*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:80-5.
- 45 Homma A, Furuta Y, Oridate N, Nakano Y, Kohashi G, Yagi K, et al. *Prognostic significance of clinical parameters and biological markers in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck treated with concurrent chemoradiotherapy*. *Clin Cancer Res* 1999;5:801-6.
- 46 Hong WK, O'Donoghue GM, Sheetz S, Fofonoff S, Dorman EB, Welch J, et al. *Sequential response patterns to chemotherapy and radiotherapy in head and neck cancer: potential impact of treatment in advanced laryngeal cancer*. *Prog Clin Biol Res* 1985;201:191-7.
- 47 Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E. *Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer*. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:455-60.
- 48 Jackel MC, Sellmann L, Dorudian MA, Youssef S, Fuzesi L. *Prognostic significance of p53/bcl-2 co-expression in patients with laryngeal squamous cell carcinoma*. *Laryngoscope* 2000;110:1339-45.
- 49 Jares P, Fernandez PL, Campo E, Nadal A, Bosch F, Aiza G, et al. *PRAD-1/cyclin D1 gene amplification correlates with messenger RNA overexpression and tumor progression in human laryngeal carcinomas*. *Cancer Res* 1994;54:4813-7.
- 50 Jesse RH, Sugarbaker EV. *Squamous cell carcinoma of the oropharynx: why we fail*. *Am J Surg* 1976;132:435-8.
- 51 Khafif RA, Gelbfish GA, Tepper P, Attie JN. *Elective radical neck dissection in epidermoid cancer of the head and neck*. *Cancer* 1991;67:67-71.
- 52 Kobayashi T, Ruan S, Clodi K, Kliche KO, Shiku H, Andreoff M, et al. *Overexpression of Bax gene sensitizes K562 erythroleukemia cells to apoptosis induced by selective chemotherapeutic agents*. *Oncogene* 1998;16:1587-91.
- 53 Koch WM, Brennan JA, Zahurak M, Goodman SN, Westra WH, Schwab D, et al. *p53 mutation and locoregional treatment failure in head and neck squamous cell carcinoma*. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1580-6.
- 54 Kokoska MS, Piccirillo JF, el-Mofty SK, Emami B, Haughey BH, Schoinick SB. *Prognostic significance of clinical factors and p53 expression in patients with glottic carcinoma treated with radiation therapy*. *Cancer* 1996;78:1693-700.
- 55 Kumagai S, Kojima S, Imai K, Nakagawa K, Yamamoto E, Kawahara E, et al. *Immunohistologic distribution of basement membrane in oral squamous cell carcinoma*. *Proceedings 3rd International Conference on Head and Neck Cancer*.
- 56 Lavertu P, Adelstein DJ, Myles J, Secic M. *P53 and Ki-67 as outcome predictors for advanced squamous cell cancers of the head and neck treated with chemoradiotherapy*. *Laryngoscope* 2001;111:1878-92.
- 57 Leonard JH, Kearsley JH, Chenevix-Trench G, Hayward NK. *Analysis of gene amplification in head-and-neck squamous-cell carcinoma*. *Int J Cancer* 1991;48:511-5.
- 58 Lera J, Lara PC, Perez S, Cabrera JL, Santana C. *Tumor proliferation, p53 expression, and apoptosis in laryngeal carcinoma: relation to the results of radiotherapy*. *Cancer* 1998;83:2493-501.
- 59 Lydiatt WM, Davidson BJ, Shah J, Schantz SP, Chaganti RS. *The relationship of loss of heterozy-*

- gosity to tobacco exposure and early recurrence in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Surg* 1994;168:437-50.
- 60 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.
- 61 Maestro R, Gasparotto D, Vukosavljevic T, Barzan L, Sulfaro S, Boiocchi M. *Three discrete regions of deletion at 3p in head and neck cancers*. *Cancer Res* 1993;53:5775-9.
- 62 Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M, Erozan YS, Merlo A, Schwab D, et al. *Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis*. *Science* 1996;271:659-62.
- 63 Masuda M, Hirakawa N, Nakashima T, Kuratomi Y, Komiyama S. *Cyclin D1 overexpression in primary hypopharyngeal carcinomas*. *Cancer* 1996;78:390-5.
- 64 Masuda M, Kuratomi Y, Shiratsuchi H, Nakashima T, Naonobu K, Komiyama S. *Decreased CD44H expression in early-stage tongue carcinoma associates with late nodal metastases following interstitial brachytherapy*. *Head Neck* 2000;22:662-5.
- 65 Mattijssen V, Peters HM, Schalkwijk L, Manni JJ, van 't Hof-Grootenboer B, de Mulder PH, et al. *E-cadherin expression in head and neck squamous-cell carcinoma is associated with clinical outcome*. *Int J Cancer* 1993;55:580-5.
- 66 Mauceri HJ, Hanna NN, Beckett MA, Gorski DH, Staba MJ, Stellato KA, et al. *Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumour therapy*. *Nature* 1998;394:287-91.
- 67 Maurizi M, Almadori G, Ferrandina G, Distefano M, Romanini ME, Cadoni G, et al. *Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma*. *Br J Cancer* 1996;74:1253-7.
- 68 Michalides RJ, van Veelen NM, Kristel PM, Hart AA, Loftus BM, Hilgers FJ, et al. *Overexpression of cyclin D1 indicates a poor prognosis in squamous cell carcinoma of head and neck*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:497-502.
- 69 Milas L, Kishi K, Hunter N, Mason K, Masferrer JL, Tofilon PJ. *Enhancement of tumor response to gamma-radiation by an inhibitor of cyclooxygenase-2 enzyme*. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1501-4.
- 70 Muller D, Millon R, Lidereau R, Engelmann A, Bronner G, Flesch H, et al. *Frequent amplification of 11q13 DNA markers is associated with lymph node involvement in human head and neck squamous cell carcinomas*. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1994;30:113-20.
- 71 Nathan CA, Carter P, Liu L, Li BD, Abreo F, Tudor A, et al. *Elevated expression of eIF4E and FGF-2 isoforms during vascularization of breast carcinomas*. *Oncogene* 1997;15:1087-94.
- 72 Nathan CA, Franklin S, Abreo FW, Nassar R, De Benedetti A, Glass J. *Analysis of surgical margins with the molecular marker eIF4E: a prognostic factor in patients with head and neck cancer*. *J Clin Oncol* 1999;17:2909-14.
- 73 Nawroz H, van der Riet P, Hruban RH, Koch W, Ruppert JM, Sidransky D. *Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma*. *Cancer Res* 1994;54:1152-5.
- 74 Nordmark M, Overgaard J. *A confirmatory prognostic study on oxygenation status and loco-regional control in advanced head and neck squamous cell carcinoma treated by radiation therapy*. *Radiother Oncol* 2000;57:39-43.
- 75 Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death*. *Cell* 1993;74:609-19.
- 76 Osman I, Sherman E, Singh B, Venkatraman E, Zelefsky M, Bosl G, et al. *Alteration of p53 pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck: impact on treatment outcome in patients treated with larynx preservation intent*. *J Clin Oncol* 2002;20:2980-7.
- 77 Pai HH, Rochon L, Clark B, Black M, Shenouda G. *Overexpression of p53 protein does not predict local-regional control or survival in patients with early-stage squamous cell carcinoma of the glottic larynx treated with radiotherapy*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;41:37-42.
- 78 Patel MM, Patel DD, Parekh LJ, Raval GN, Rawal RM, Bhatavdekar JM, et al. *Evaluation of telomerase activation in head and neck cancer*. *Oral Oncol* 1999;35:510-5.
- 79 Patten C, Hillel AD. *The 11th nerve syndrome. Accessory nerve palsy or adhesive capsulitis?* *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;119:215-20.
- 80 Pfister DG, Shaha AR, Harrison LB. *The role of chemotherapy in the curative treatment of head and neck cancer*. *Surg Oncol Clin N Am* 1997;6:749-68.
- 81 Piffko J, Bankfalvi A, Tory K, Fuzesi L, Bryne M, Ofner D, et al. *Molecular assessment of p53 ab-*

- normalities at the invasive front of oral squamous cell carcinomas. *Head Neck* 1998;20:8-15.
- 82 Pignataro L, Pruneri G, Carboni N, Capaccio P, Cesana BM, Neri A, et al. *Clinical relevance of cyclin D1 overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma*. *J Clin Oncol* 1998;9:3069-77.
- 83 Prescott SM, Fitzpatrick FA. *Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis*. *Biochim Biophys Acta* 2000;1470:M69-78.
- 84 Pruneri G, Pignataro L, Carboni N, Ronchetti D, Cesana BM, Ottaviani A, et al. *Clinical relevance of p53 and bcl2 protein overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma*. *Int J Cancer* 1998;79:263-8.
- 85 Pukkila MJ, Kumpulainen EJ, Virtaniemi JA, Johansson RT, Halonen PM, Kellokoski JK, et al. *Nuclear and cytoplasmic p53 expression in pharyngeal squamous cell carcinoma: Prognostic implications*. *Head Neck* 2002;24:784-91.
- 86 Ranelletti FO, Almadori G, Rocca B, Ferrandina G, Ciabattini G, Habib A, et al. *Prognostic significance of cyclooxygenase-2 in laryngeal squamous cell carcinoma*. *Int J Cancer* 2001;95:343-9.
- 87 Ravi D, Ramadas K, Mathew BS, Panikkar KR, Nair MK, Pillai MR. *Apoptosis, angiogenesis and proliferation: trifunctional measure of tumour response to radiotherapy for oral cancer*. *Oral Oncol* 2001;37:164-71.
- 88 Ries JC, Hassfurther E, Steininger H, Kloss FR, Wiltfang J, Girod SC, et al. *Correlation of telomerase activity, clinical prognosis and therapy in oral carcinogenesis*. *Anticancer Res* 2001;21:1057-63.
- 89 Rinaldi Ceroni A, Galli V. *Criteria di radicalità nei tumori testa e collo*. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2000;20:375-9.
- 90 Riva C, Lavieille JP, Reyt E, Brambilla E, Lunardi J, Brambilla C. *Differential c-myc, c-jun, c-raf and p53 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck: implication in drug and radioresistance*. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995;31B:384-91.
- 91 Rossi L, Reverberi D, Podesta G, Lastraioli S, Corvo R. *Co-culture with human fibroblasts increases the radiosensitivity of MCF-7 mammary carcinoma cells in collagen gels*. *Int J Cancer* 2000;85:667-73.
- 92 Sakr WA, Zarbo RJ, Jacobs JR, Crissman JD. *Distribution of basement membrane in squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Hum Pathol* 1987;18:1043-50.
- 93 Sardi I, Franchi A, Ferriero G, Frittelli A, Bruschini L, Montali E, et al. *Prediction of recurrence by microsatellite analysis in head and neck cancer*. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;29:201-6.
- 94 Schipper JH, Frixen UH, Behrens J, Unger A, Jahnke K, Birchmeier W. *E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis*. *Cancer Res* 1991;51:6328-37.
- 95 Schuller DE, Reiches NA, Hamaker RC, Lingeman RE, Weisberger EC, Suen JY, et al. *Analysis of disability resulting from treatment including radical neckdissection or modified neck dissection*. *Head Neck Surg* 1983;6:551-8.
- 96 Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. *bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes*. *Cell* 1991;67:879-88.
- 97 Shah JP, Medina JE, Shaha AR, Schantz SP, Marti JR. *Cervical lymph node metastasis*. *Curr Probl Surg* 1993;30:1-335.
- 98 Slaughter DP. *Ulticentric origin of intraoral carcinoma*. *Surgery* 1946;20:133-46.
- 99 Slaughter DP, Soutwick HW, Smejkal W. *Field cancerization in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin*. *Cancer* 1953;5:963.
- 100 Smith BD, Smith GL, Carter D, DiGiovanna MP, Kasowitz KM, Sasaki CT, et al. *Molecular marker expression in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;127:780-5.
- 101 Snow GB. *Evaluation and staging of patients with head and neck cancer*. In: Meyers EN, Suen JY, eds. *Cancer of the Head and Neck 2nd Ed*. New York: Churchill Livingstone 1989:17-38.
- 102 Spafford MF, Koeppel J, Pan Z, Archer PG, Meyers AD, Franklin WA. *Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;122:627-32.
- 103 Steiner G, Schoenberg MP, Linn JF, Mao L, Sidransky D. *Detection of bladder cancer recurrence by microsatellite analysis of urine*. *Nat Med* 1997;3:621-4.

- 104 Stell PM. *Ploidy in head and neck cancer: a review and meta-analysis*. Clin Otolaryngol 1991;16:510-6.
- 105 Strasser A, Harris AW, Cory S. *bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship*. Cell 1991;67:889-99.
- 106 Sugimoto C, Fujieda S, Seki M, Sunaga H, Fan GK, Tsuzuki H, et al. *Apoptosis-promoting gene (bax) transfer potentiates sensitivity of squamous cell carcinoma to cisplatin in vitro and in vivo*. Int J Cancer 1999;82:860-7.
- 107 Takedo NM. *Cyclooxygenase 2 inhibitors in tumorigenesis*. J Natl Cancer Inst 1998;90:1609-20.
- 108 Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Schuurings E, Hermans J, Vis AA, Litvinov SV, et al. *Markers for assessment of nodal metastasis in laryngeal carcinoma*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1997;123:412-9.
- 109 Tanaka N, Ogi K, Odajima T, Dehari H, Yamada S, Kimijima Y, et al. *pRb/p130 protein expression is correlated with clinicopathological findings in patients with oral squamous cell carcinoma*. Cancer 2001;92:2117-25.
- 110 Temam S, Flahault A, Perie S, Monceaux G, Coulet F, Callard P, et al. *p53 gene status as a predictor of tumor response to induction chemotherapy of patients with locoregionally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck*. J Clin Oncol 2000;18:385-94.
- 111 Tylor M, Franzen G, Olofsson J. *DNA ploidy in oral cavity carcinomas, with special reference to prognosis*. Head Neck 1989;11:257-63.
- 112 van den Brekel MW, Castelijns JA, Stel HV, Golding RP, Meyer CJ, Snow GB. *Modern imaging techniques and ultrasound-guided aspiration cytology for the assessment of neck node metastases: a prospective comparative study*. Eur Arch Otorhinolaryngol 1993;250:11-7.
- 113 Vandenbrouck C. *Elective neck vs therapeutic radical neck dissection in epidermoid carcinoma of the oral cavity. Results of a randomized clinical trial*. Cancer 1980;46:386-94.
- 114 Vikram B. *Changing patterns of failure in advanced head and neck cancer*. Arch Otolaryngol 1984;110:564-5.
- 115 Vikram B, Strong EW, Shah JP, Spiro R. *Failure in the neck following multimodality treatment for advanced head and neck cancer*. Head Neck Surg 1984;6:724-9.
- 116 Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. *Head and neck cancer*. N Engl J Med 1993;328:184-94.
- 117 Wang Y, Hung SC, Linn JF, Steiner G, Glazer AN, Sidransky D, et al. *Microsatellite-based cancer detection using capillary array electrophoresis and energy-transfer fluorescent primers*. Electrophoresis 1997;18:1742-9.
- 118 Warnakulasuriya S. *Lack of molecular markers to predict malignant potential of oral precancer*. J Pathol 2000;190:407-9.
- 119 Weidner N. *Intratumor microvessels density as a prognostic factor in cancer*. Am J Pathol 1995;147:9-19.
- 120 Wen QH, Miwa T, Yoshizaki T, Nagayama I, Furukawa M, Nishijima HI. *Prognostic value of EGFR and TGF-alpha in early laryngeal cancer treated with radiotherapy*. Laryngoscope 1996;106:884-8.
- 121 Wilson GD, Saunders MI, Dische S, Richman PI, Daley FM, Bentzen SM. *bcl-2 expression in head and neck cancer: an enigmatic prognostic marker*. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2001;49:435-41.
- 122 Wilson GD, Grover R, Richman PI, Daley FM, Saunders MI, Dische S. *Bcl-2 expression correlates with favourable outcome in head and neck cancer treated by accelerated radiotherapy*. Anticancer Res 1996;16:2403-8.
- 123 Yuen PW, Lam KY, Choy JT, Ho WK, Wei WI. *Clinicopathological significance of p53 and p21 expression in the surgical treatment of laryngeal carcinoma*. Anticancer Res 2000;20:4863-6.
- 124 Zatterstrom UK, Brun E, Willen R, Kjellen E, Wennerberg J. *Tumor angiogenesis and prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck*. Head Neck 1995;17:312-8.

VIII. STUDIO DI APPLICABILITÀ E FATTIBILITÀ DEI FATTORI PROGNOSTICI MOLECOLARI

T. Martone, L. Pignataro*, R. Albera, F. Palonta, G. Cortesina

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 e 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 alla 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 locoregionali 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 al-

II Clinica ORL, Università di Torino;

* I Clinica ORL, Ospedale Maggiore Policlinico IRCCS, Università di Milano

terazioni 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.

Alla luce di queste premesse emerge che le problematiche da affrontare nella ricerca e nell'utilizzo, nella pratica clinica, di eventuali indicatori molecolari sono molteplici e riguardano numerosi aspetti.

STUDI DI APPLICABILITÀ

Definizione di indicatore molecolare prognostico

Per valutare correttamente e fare un'analisi critica dei dati della letteratura sui fattori prognostici e predittivi in ambito oncologico-clinico, vi è la necessità di definire correttamente il termine di «fattore prognostico». Infatti, a tutt'oggi, esiste una notevole confusione sull'utilizzo dei seguenti termini che, di frequente, vengono utilizzati come sinonimi:

- Indicatore molecolare di rischio;
- Indicatore molecolare prognostico;
- Indicatore molecolare diagnostico;
- Indicatore molecolare predittivo.

Sulla base di quanto riportato da Chiesa⁸ in una «review» del 1999, potremmo definire:

- *Indicatori molecolari di rischio* 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).

- *Indicatori molecolari prognostici* 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.

- *Indicatori molecolari diagnostici* quelle alterazioni genetiche che si avverano nei primi stadi della malattia, consentendone la diagnosi precoce.

- *Indicatori molecolari predittivi* quelli in grado di predire la risposta ad uno specifico trattamento.

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^{6, 27}. 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 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 e indicatori tessuto-specifici:

Gli indicatori tumore-specifici sono indicativi di alterazioni geniche 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).

Attendibilità di un indicatore molecolare prognostico

Oltre ai problemi legati alla terminologia e 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) ⁵, 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.

Affidabilità di un indicatore prognostico molecolare

Al fine di approntare test prognostici e/o diagnostici basati su criteri di affidabilità, cioè che forniscano informazioni «significative» sull'evoluzione di una patologia neoplastica e sulla sua possibile risposta alle opzioni terapeutiche, le osservazioni promettenti su piccole serie di pazienti ed i risultati relativi al loro eventuale utilizzo, dovrebbero essere sempre validate da studi retrospettivi o prospettici effettuati su coorti costituite da un numero di soggetti adeguato (almeno 100) ed omogenee, cioè accomunate dalla stessa sede tumorale e dalle stesse caratteristiche del tumore.

Dal punto di vista organizzativo, ciò richiede un facile accesso ai tessuti pato-

Tab. I.

Fattori molecolari potenziali markers di prognosi dei carcinomi HNSCC.

-
- Instabilità cromosomica e microsattelliti
 - Recettori per fattori di crescita
EGFR
ErbB-2
 - Proteine regolatorie del ciclo cellulare
P16, p21, p27, ciclina D1
 - Gene oncosoppressore p53
 - Telomerasi
 - Proteine regolatorie dell'apoptosi
Bcl2/Bax
 - Fattori angiogenetici
VEGF, bFGF MMP2, MMP9
 - Molecole di adesione
Integrine, laminine, caderine
-

Fonte: Hussein MR, Cullen K. *Molecular biomarkers in HNSCC, prognostic and therapeutic implications*. Expert Rev Anticancer Ther 2001.

logici umani, sia su materiale patologico di archivio che su materiale biotipico fresco, ed un valido follow-up clinico. Inoltre, i risultati ottenuti con tecniche di analisi molecolare devono necessariamente essere associati all'esame istopatologico classico dei tumori e a tutti i rilevanti parametri clinici dei pazienti.

L'utilità clinico-applicativa dei potenziali fattori utilizzabili come indicatori molecolari deve inoltre emergere da analisi statistiche adeguate, attraverso analisi multivariate, per verificare l'indipendenza delle informazioni prognostiche fornite.

Al momento, per i tumori del distretto cervico-facciale, nessuno dei fattori molecolari alterati nelle varie fasi del processo di cancerogenesi (Tab. I), è «routinariamente» utilizzato come marker prognostico, diagnostico o predittivo nella pratica clinica. Nelle Tabelle II, III, IV e V sono schematizzati gli studi riportati in letteratura sul significato prognostico di alcuni tra i fattori molecolari coinvolti nelle neoplasie del distretto testa-collo. Come si evince da un'attenta e critica 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 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. Come riportato in una recente review di Soussi e Beroud (2001)²⁵, occorrerebbe validare la significatività dei fattori prognostici nello stesso modo in cui viene valutata l'efficacia dei trattamenti farmacologici, cioè attraverso trials di fase I, II, o III. Gli studi preliminari di fase I permetterebbero di esplorare l'eventuale associazione esistente tra un potenziale indicatore e la malattia e, cosa importante, di definire un metodo standardizzato di analisi. Quelli di fase II dovrebbero valutare l'u-

Tab. II.

Significato prognostico di p53 in HNSCC trattati chirurgicamente +/- xrt/ct: correlazione con recidive e sopravvivenza all'Analisi Multivariata.

Autori	n° casi	% p53	sopravv	recidiva
Shin et al., 1996 ²⁴	69	52% (ICH+)	sì	sì
Koch et al., 1996 ¹⁴	110	44% (mut)	no	sì
Michaelides et al., 1997	¹⁸ 115	42% (ICH+)	no	no
Hirvikoski et al., 1997 ¹²	99	68% (ICH+)	sì	sì
Pruneri et al., 1998 ²²	149	50% (ICH+)	no	–
Jin et al., 1998 ²⁶	83	71% (ICH+)	sì	–
Caminero et al., 1998 ⁷	106	43% (ICH+)	sì	no
Jackel et al., 2000 ¹³	88	77% (ICH+)	sì	–

Tab. III.

Significato prognostico di p53 in HNSCC trattati solo con radioterapia: correlazione con recidive e sopravvivenza all'Analisi Multivariata.

Autori	n° casi	% p53	sopravv	recidiva
Overgaard et al., 1998 ²⁰	68	66% (ICH+) 42% (mut)	sì (mut)	sì (mut)
Raybaud-Diogene et al., 1996 ²³	101	49% (ICH+)	sì	sì
Kokoska et al., 1996 ¹⁵	70	61% (ICH+)	–	no
Awwad et al., 1997 ²	79	53% (ICH+)	no	no

Tab. IV.

Significato prognostico della Ciclina D1 in HNSCC: correlazione con recidive e sopravvivenza all'Analisi Multivariata.

Autore	casi	% espr	% amplif	recidiva	sopravv	analisi multivariata
Pignataro et al., 1998 ²¹	149	32%		sì	sì (p = 0,06)	sì
Bova et al., 1999 ⁴	148	68%			sì (p = 0,01)	sì
Akervall et al., 1997 ¹	75	41%	12%		sì (p = 0,05)	sì
Michalides et al., 1997 ¹⁸	115	49%		sì		sì
Dong et al., 2001 ¹⁰	102	58%		sì	sì	sì
Bellacosa et al., 1996 ³	51		18%		sì (p = 0,03)	sì
Kyomoto et al., 1997 ¹⁶	45	53%	22%		sì (p = 0,0001)	sì (amplif)
Namazie et al., 2002 ¹⁹	102		30%	sì	sì	sì (amplif)

Tab. V.

Significato prognostico di EGFR in HNSCC: correlazione con recidive e sopravvivenza all'Analisi Multivariata.

Autore	casi	EGFR espr	recidiva	sopravv	analisi multivariata
Dassonville et al., 1993 ⁹	109	71 fmol/mg (RIA)	sì	sì	sì
Maurizi et al., 1996 ¹⁷	140	8 fmol/mg (RIA)	sì (p = 0,05)	sì (p = 0,0001)	sì
Grandis et al., 1998 ¹¹	91	54% (ICH)	sì	sì	sì

tilità clinica del marker, definendo un cut-off di alto e basso rischio. Quelli di fase III dovrebbero essere studi prospettici di conferma dei risultati precedentemente ottenuti e, per questo, essere condotti su grandi coorti di pazienti e comparati con altri fattori ben definiti. Gli stessi Autori ²⁵ 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 sovraespressione di ErbB-1 o EGF-R e di ErbB-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.

STUDI DI FATTIBILITÀ

La scelta di utilizzare a scopo prognostico e/o diagnostico un determinato indicatore molecolare dipende dalla «sensibilità» e «specificità» del metodo d'analisi e quindi, in prima istanza, dalle metodologie utilizzate.

Analisi dei metodi di laboratorio

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.

Tecniche istochimiche

Le tecniche istochimiche si basano sull'applicazione, a preparati istologici e citologici, di metodologie enzimatiche e immunologiche atte a fornire informazioni più accurate sulla natura e sul comportamento biologico del tumore sulla base del quadro morfologico.

In particolare, l'uso in diagnostica dell'istochimica consiste nell'individuazione, nei reperti biotipici di tessuto, di particolari markers (proteine o RNA) che non sono normalmente presenti in un tessuto sano o la cui espressione è alterata.

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

- immunistochimica: valutazione «in situ» dell'espressione di proteine mediante l'utilizzo di specifici anticorpi;
- ibridazione in situ: valutazione «in situ» della presenza di acidi nucleici, associati alla trasformazione tumorale, mediante corte sequenze oligonucleotidiche complementari alla sequenza genica bersaglio;
- FISH: analisi cromosomica basata sulla tecnica di ibridazione in situ con metodo di rilevazione fluorescente.

Tecniche molecolari

L'avvento della tecnologia di PCR o Polymerase Chain Reaction (reazione di polimerizzazione a catena), per l'amplificazione enzimatica del DNA, ha aperto la strada per l'utilizzo dell'analisi diretta dell'informazione contenuta negli acidi nucleici come metodo investigativo nella ricerca in campo biologico.

La PCR è una tecnica di amplificazione genica che sfrutta la capacità di un enzima, la DNA polimerasi, di sintetizzare in vitro fino a 10^9 copie di qualsiasi segmento specifico di DNA. Uno degli aspetti fondamentali della reazione di PCR è l'enorme potere di amplificazione delle sequenze geniche bersaglio, indispensabile per l'applicazione successiva di una qualsiasi delle tecniche di biologia molecolare.

Nonostante i limiti al suo utilizzo (Tab. VII), rappresentati soprattutto dal rischio di contaminazione del campione di partenza da parte di materiale esogeno o, nel caso di tessuti tumorali, da parte di cellule normali, la PCR ha raggiunto un ottimo livello di affidabilità.

Campioni utilizzabili per la reazione di PCR

DNA genomico o RNA (che deve essere prima retrotrascritto a c-DNA) estratto da:

- biopsie o tessuti paraffinati fissati in formalina
- cellule in coltura
- sangue
- siero
- fluidi e altri materiali biologici
- materiale microbico (virus o batteri)

Campi di applicazione della PCR

Può essere utilizzata per l'identificazione di alterazioni geniche come «marcatori molecolari» di neoplasie:

- verifica dell'espressione (RNA) di un dato gene in un tessuto
- analisi quantitativa dell'espressione genica (PCR quantitativa)
- ricerca di delezioni e inserzioni e riarrangiamenti genici
- ricerca di mutazioni puntiformi già note (raramente screening di mutazioni) in geni onco-soppressori e oncogeni
- analisi di variabilità genetica o polimorfismi genici (RFLP e microsatelliti)
- valutazione della «malattia minima residua» (MRD)

Utilizzo in clinica delle analisi di PCR

- diagnosi precoce (precedente ad una definita alterazione istologica)
- prognosi
- predittività di risposta terapeutica
- monitoraggio del paziente

Marcatore molecolari più studiati in oncologia molecolare

In campo oncologico si ricercano in genere le alterazioni (amplificazioni, riarrangiamenti, traslocazioni, delezioni, inserzioni e mutazioni puntiformi) in oncogeni e geni onco-soppressori. La Tabella VI illustra i marcatori molecolari generalmente studiati nei diversi tumori umani.

Tab. VI.

Marcatore molecolari più studiati nei diversi tumori umani.

K-ras	polmone, vescica, ovaio, colon e pancreas
Neu/erb-B2	mammella, testa-collo
Myc	leucemie
APC	colon
p53	tutti
BRCA1, BRCA2	mammella, ovaio

Tab. VII.

Vantaggi e limiti all'utilizzo della PCR in campo clinico

Vantaggi	Limiti
alta sensibilità	specificità
rapidità	costi elevati
riproducibilità	

Applicazioni post-PCR

La PCR permette di ottenere elevata quantità di prodotti specifici anche da campioni contenenti quantità di acidi nucleici estremamente ridotte che non consentirebbero le successive analisi con le tecniche tradizionali.

Tra le analisi successive rientrano:

- Rilevazione di mutazioni note (es. mutazioni note al codone 12 e 16 dell'oncogene ras) mediante le seguenti analisi molecolari post-PCR:

Sequenziamento diretto del prodotto di PCR

Ibridazione specifica con oligonucleotidi (ASO, MASA)

Esame di un sito di restrizione

Amplificazione allele-dipendente (ARMS)

- Rilevazione di mutazioni sconosciute (es. screening di mutazioni del gene on-

co-soppressore p53 nei diversi tipi di tumore) mediante le seguenti tecniche molecolari:

- Sequenziamento diretto
- Elettroforesi in gradiente denaturante (DGGE)
- Analisi dei polimorfismi di conformazione del DNA a singolo filamento (SSCP)
- Taglio chimico degli appaiamenti errati (CMC)
- Taglio enzimatico degli appaiamenti errati (RNase cleavage)
- Analisi dei polimorfismi del DNA su base genetica (predisposizione o rischio genetico)
- Analisi del polimorfismo dei siti di restrizione
- Analisi di Microsatelliti

ANALISI DEI COSTI

Una sostanziale parte della ricerca oncologica è ora rivolta non solo a sviluppare nuove tecnologie diagnostiche di tipo molecolare, ma anche a favorirne l'inserimento in protocolli di diagnosi integrata, caratterizzati da alta efficacia e bassi rapporti costo-beneficio.

Allo stato attuale, ad un attento esame della letteratura, considerando solo quegli studi che prendono in esame casistiche > 80 soggetti e con significatività statistica all'analisi multivariata, i fattori molecolari relativi ai carcinomi della testa e del collo che potrebbero essere utilizzati routinariamente con le procedure diagnostiche di laboratorio sopra descritte sono riportate nella Tabella VIII.

La specificità e la riproducibilità delle tecniche di analisi istochimiche hanno permesso di raggiungere alti livelli di affidabilità e precisione. Inoltre la facilità della tecnica, insieme con il relativo basso costo, fanno sì che tale tecnica sia facilmente applicabili a grandi screening di popolazione.

Costo dei reattivi: 7-10 euro

Tempi di esecuzione: 5 ore

Numero di reazioni effettuabili da una persona: dalle 20 alle 30 al giorno

Costo dell'esame: 10-15 euro

Le diverse tecniche di analisi molecolare (PCR quantitativa, sequenziamento genico, analisi dei microsatelliti) hanno il vantaggio, nell'insieme, di essere molto sensibili (80%-99%) ma il limite al loro utilizzo in analisi di routine in campo cli-

Tab. VIII.

Fattori prognostici molecolari sperimentali negli HNSCC.

espressione della ciclina D1
espressione dell'oncogene EGF-R
espressione dell'oncogene ERB-B2/neu
espressione e analisi delle mutazioni di P53
studio delle molecole di adesione
riarrangiamenti di 11q13

nico-oncologico è rappresentato dalla laboriosità del metodo e dai costi ancora molto elevati. Il costo elevato è imputabile:

– all'utilizzo di apparecchiature costose che richiedono ammortamento e manutenzione. Tali strumenti non sono in genere presenti in tutti i laboratori annessi alla Clinica

- PCR real-time, per l'analisi quantitativi dell'espressione di determinati geni (costo strumento ca 40-60.000 euro)

- Sequenziatore automatico per lo studio di mutazioni di oncogeni e geni oncosoppressori e per l'analisi di microsatelliti (costo strumento ca 50-60.000 euro)

- Citofluorimetro per lo studio di indici di proliferazione cellulare quali analisi del ciclo cellulare (costo strumento ca 50-70.000 euro)

– all'uso di reattivi che non sono attualmente utilizzati a scopo di indagini di routine, ma solo per ricerche sperimentali il cui costo è estremamente variabile ma pur sempre molto elevato (un kit per PCR può costare, per 100 reazioni, dai 500 ai 1000 euro, gli anticorpi monoclonali da usare in citofluorimetria hanno un costo variabile per 100 reazioni dai 100 ai 600 euro)

– al fatto che le metodiche non sono standardizzate per cui è richiesto un costo aggiuntivo in termini di tempi e di personale altamente qualificato oltre che di personale tecnico.

Da quanto detto si evince che il costo di un'analisi molecolare è molto variabile e può oscillare dalle dai 15 ai 40 euro. L'ostacolo da superare, per consentire all'analisi molecolare di sostituire altre metodiche indirette di indagine di routine nella diagnostica, è quello dell'automazione, per consentire un incremento della riproducibilità, un aumento della produttività ed una diminuzione dei costi.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

I requisiti tecnologici necessari, di struttura, strumentazione e personale specializzato, con relativi alti costi, per realizzare l'obiettivo di allargare alla biologia molecolare (con riguardo a quei markers per cui esiste un back-ground sperimentale «consolidato») la stadiazione dei tumori testa-collo, limitano necessariamente il loro utilizzo a centri strutturalmente avanzati (Dipartimenti e Istituti Oncologici, Comprehensive Cancer Center) e che potremmo definire Centri di 2° livello, che in una logica di Rete Oncologica Regionale, potrebbero diventare ospedali che trattano pazienti oncologici. Questo modello organizzativo è già in fase avanzata nella Regione Piemonte, dove esiste una Rete Oncologica e 2 Centri di Riferimento (Dipartimento di Oncologia - COES Azienda Molinette; IRCC di Candiolo).

L'importanza di questi centri consiste nella possibilità di perfezionare e consolidare la stadiazione molecolare oggi possibile, e di sperimentare, nuovi markers, con l'obiettivo finale di diffonderli, a tempi lunghi, anche a centri più periferici, pre-
vi investimenti strutturali.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Akervall JA, Michalides RJ, Mineta H, Balm A, Borg A, Dictor MR, et al. *Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression*. *Cancer* 1997;79:380-9.
- ² Awwad S, Jaros E, Somes J, Lunec J. *p53 overexpression in head and neck carcinoma and radiotherapy results*. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 1996;34:3232-332.
- ³ Bellacosa A, Almadori G, Cavallo S, Cadoni G, Galli J, Ferrandina G, et al. *Cyclin D1 gene amplification in human laryngeal squamous cell carcinomas: Prognostic significance and clinical implications*. *Clin Cancer Res* 1996;2:175-80.
- ⁴ Bova RJ, Quinn DI, Nankervis JS, Cole IE, Sheridan BF, Jensen MJ, et al. *Cyclin D1 and p16INK4A expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue*. *Clin Cancer Res* 1999;2:175-80.
- ⁵ Brennan JA, Sidransky D. *Molecular staging of head and neck squamous carcinoma*. *Cancer Metastasis Rev* 1996;15:3-10. Review.
- ⁶ 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.
- ⁷ Caminero MJ, Nunez F, Suarez C, Ablanado P, Riera JR, Dominguez F. *Detection of p53 protein in oropharyngeal carcinoma. Prognostic implications*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;122:769-72.
- ⁸ Chiesa F, Mauri S, Tradati N, Calabrese L, Giugliano G, Ansarin M, et al. *Surfing prognostic factors in head and neck cancer at the millennium*. *Oral Oncol* 1999;35:590-6. Review.
- ⁹ Dassonville O, Formento JL, Francoual M, Ramaioli A, Santini J, Schneider M, et al. *Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer*. *J Clin Oncol* 1993;11:1873-8.
- ¹⁰ Dong Y, Sui L, Sugimoto K, Tai Y, Tokuda M. *Cyclin D1-CDK4 complex, a possible critical factor for cell proliferation and prognosis in laryngeal squamous cell carcinomas*. *Int J Cancer* 2001;95:209-15.
- ¹¹ Grandis JR, Tweardy DJ. *Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer*. *Cancer Res* 1993;53:3579-84.
- ¹² Hirvikoski P, Kumpulainen E, Virtaniemi J, Johansson R, Haapasalo H, Marin S, et al. *p53 expression and cell proliferation as prognostic factors in laryngeal squamous cell carcinoma*. *J Clin Oncol* 1997;15:3111-20.
- ¹³ Jackel MC, Sellmann L, Dorudian MA, Youssef S, Fuzesi L. *Prognostic significance of p53/bcl-2 coexpression in patients with laryngeal squamous cell carcinoma*. *Laryngoscope* 2000;110:1339-45.
- ¹⁴ Koch WM, Brennan JA, Zahurak M, Goodman SN, Westra WH, Schwab D, et al. *p53 mutation and locoregional treatment failure in head and neck squamous cell carcinoma*. *J Nat Cancer Inst* 1996;88:1580-6.
- ¹⁵ Kokoska MS, Piccirillo JF, el-Mofty SK, Emami B, Haughey BH, Schoinick SB. *Prognostic significance of clinical factors and p53 expression in patients with glottic carcinoma treated with radiation therapy*. *Cancer* 1996;78:1693-700.
- ¹⁶ Kyomoto R, Kumazawa H, Toda Y, Sakaida N, Okamura A, Iwanaga M, et al. *Cyclin-D1-gene amplification is a more potent prognostic factor than its protein over-expression in head and neck squamous cell carcinoma*. *Int J Cancer* 1997;74:576-81.
- ¹⁷ Maurizi M, Almadori G, Ferrandina G, Distefano M, Romanini ME, Cadoni G, Benedetti-Panici P, et al. *Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma*. *Br J Cancer* 1996;74:1253-5.
- ¹⁸ Michalides RJ, van Veelen NM, Kristel PM, Hart AA, Loftus BM, Hilgers FJ, et al. *Overexpression of cyclin D1 indicates a poor prognosis in squamous cell carcinoma of head and neck*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:497-502.
- ¹⁹ Namazie A, Alavi S, Olopade OI, Pauletti G, Aghamohammadi N, Aghamohammadi M, et al. Cy-

- clin D1 amplification and p16(MTS1/CDK4I) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors.* Laryngoscope 2002;112:472-81.
- 20 Overgard J., Sorensen S.B., Stausbol-Gron B, Hoyer M, Alsner J. *TP53 mutation is an independent prognostic marker for poor outcome of radiotherapy in squamous cell carcinoma of the head and neck.* Int J Radiat Oncol Biol Phys 1998;42:43(abstract).
- 21 Pignataro L, Pruneri G, Carboni N, Capaccio P, Cesana BM, Neri A, et al. *Clinical relevance of cyclin D1 overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma.* J Clin Oncol 1998;9:3069-77.
- 22 Pruneri G, Pignataro L, Carboni N, Ronchetti D, Cesana BM, Ottaviani A, et al. *Clinical relevance of p53 and bcl-2 protein overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma.* Int J Cancer 1998;79:263-8.
- 23 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.
- 24 Shin DM, Lee JS, Lippman SM, Lee JJ, Tu ZN, Choi G, et al. *p53 expressions: predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell carcinoma.* J Natl Cancer Inst 1996;88:519-29.
- 25 Soussi T, Beroud C. *Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome.* Nat Rev Cancer 2001;1:233-40. Review.
- 26 Tai Jin Y, Kayser S, Kemp BL, Ordonez NG, Tucker SL, Clayman GL, et al. *The prognostic significance of the biomarkers p21^{WAF1/CIP1}, p53 and bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinoma.* Cancer 1998;82:2159-65.
- 27 Vogelstein B, Kinzler KW. *The multistep nature of cancer.* Trends Genet 1993;9:138-41. Review.

IX. POSSIBILE APPORTO DELL'ANALISI MOLECOLARE NELLO STAGING DEL CARCINOMA CERVICO-FACCIALE: PROPOSTA DI UN PROTOCOLLO DI RICERCA

L. Pignataro, D. Ronchetti, B. Digiuni, G. Cortesina*

RAZIONALE

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 neoplasia¹² poiché, la mancata eradicazione della malattia, costituisce la principale causa di morte nella stragrande maggioranza dei pazienti affetti da carcinomi della testa e del collo¹⁵. 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 contrastanti¹²: 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^{6 11} 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'ospite⁴.

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+)¹⁴. 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.

Inoltre, localizzazioni metastatiche possono derivare da tumori occulti che per lo più originano dal tratto aereo digestivo. Numerosi studi riportano che l'incidenza di metastatizzazione ai linfonodi laterocervicali, in questi particolari casi, sia compresa tra il 3 ed il 9%, tanto da indurre il clinico ad attuare biopsie «random» nelle aree del distretto testa e collo più facilmente sede di tumore occulto^{4 8} ed a intraprendere protocolli terapeutici particolarmente aggressivi comprendenti, per i pazienti con localizzazione linfonodale, un trattamento profilattico del collo bilaterale associato ad eventuale radioterapia sia su N che a livello dell'anello di Waldeyer⁵.

I Clinica ORL, Ospedale Maggiore Policlinico IRCCs, Università di Milano;

* II Clinica ORL, Università di Torino

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 ⁷. 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 («field cancerization») rilevabili unicamente con tecniche molecolari ¹.

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 ⁹, 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.

A questo particolare riguardo deve essere sottolineato quanto riportato da Califano (1996) ² e Mao (1997) ¹⁰. Il primo, in pazienti con carcinoma della testa e del collo, dimostra, come già evidenziato per altre neoplasie, una progressione genetica dalla lesione premaligna al carcinoma invasivo: l'autore in questo modello molecolare osserva analoghe alterazioni geniche sia nel tumore primitivo che in aree di mucosa peritumorale macroscopicamente normale ¹ supportando quanto aveva riportato Slaughter in merito alla «field cancerization». Il secondo ¹⁰, dimostrando la colonizzazione da parte di cellule clonali correlate al tumore primitivo, non solo in aree di mucosa normale ma anche in foci metastatici ed osservando inoltre delle mutazioni addizionali, asserisce che questo riscontro potrebbe essere alla base della progressione tumorale e della metastatizzazione.

Dati preliminari di Gallo et al. (2000) ¹³, 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. Infine, Califano (1999) ³ dimostra come nel 55% di biopsie su aree di mucosa normale e sui linfonodi metastatici, condotte in pazienti con metastasi linfonodali laterocervicali da tumore primitivo occulto, siano presenti analoghe alterazioni genetiche. Questi dati, se confermati in ulteriori studi, potrebbero avere un importante impatto clinico in quanto potrebbero indirizzare lo specialista ad attuare nuove strategie e protocolli terapeutici per i pazienti con localizzazioni metastatiche da tumore occulto.

ANALISI MOLECOLARE

L'analisi molecolare è basata sull'identificazione di cellule genotipicamente correlate con il tumore primitivo ma non necessariamente modificate fenotipicamente al punto da non essere facilmente riconoscibili come maligne.

Essa si focalizza sull'analisi dei «microsatelliti», una classe di elementi genetici altamente polimorfi e 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 od amplificazione all'interno della sequenza ripetuta del microsatellite atta a generare un nuovo allele che caratterizza la popolazione tumorale oppure, in individui che presentano eterozigotità nella regione del microsatellite, dalla presenza di un solo allele per una completa delezione del microsatellite su un allele (perdita di eterozigotità/LOH). 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.

METODI

Sperimentalmente l'analisi molecolare prevede diverse fasi:

– *Raccolta dei campioni.* Per ogni paziente deve essere disponibile materiale cellulare derivato dal tumore primario e un campione di tessuto sano: il loro confronto ci permette di valutare l'informatività dei microsatelliti e scegliere quali utilizzare come markers molecolari.

– *Estrazione del DNA dai campioni biologici.* Grazie all'alta sensibilità delle tecniche utilizzate, è possibile 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. È inoltre possibile ottimizzare le condizioni di amplificazione in multiplex, vale a dire analizzare in una sola reazione due o più microsatelliti.

– *Separazione degli amplificati in gel elettroforesi.* Trattasi di una «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 viene effettuata su gel di grandi dimensioni di acrilamide/bisacrilamide (19:1) concentrata al 10%. Per la rivelazione delle bande di amplificazione del DNA dopo la migrazione, si utilizza una tecnica di colorazione del DNA che prevede la precipitazione di sali di nitrato d'argento. A fianco di una elevata sensibilità di rivelazione, 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. Spesso oltre alle bande specifiche dei microsatelliti dei due alleli, si ritrovano bande extranumerarie dovute alla presenza di amplificato aspecifico generato durante la PCR. Bisogna inoltre considerare la possibile contaminazione del tessuto tumorale con il tessuto sano circostante.

SCOPO DELLO STUDIO

Alla luce di queste considerazioni e dai dati della letteratura, lo scopo 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.

OBIETTIVI FINALI

L'analisi dei microsatelliti potrebbe permettere:

1) una più appropriata stadiazione molecolare della neoplasia: in particolare a livello linfonodale attraverso il riscontro di cellule tumorali in linfonodi istologica-

mente negativi alle indagini routinarie (pN0) o per un riscontro di ulteriori linfonodi metastatici in pazienti pN+. Con questa metodica il riscontro di una correlazione statisticamente significativa tra la presenza di cellule tumorali nei linfonodi latero-cervicali e prognosi peggiore potrebbe suggerire per questi pazienti una strategia terapeutica postchirurgica più aggressiva (radioterapia postoperatoria in casi inizialmente N0 o chemioterapia in pazienti N1-3 con presenza di cloni di cellule neoplastiche in un alto numero di linfonodi).

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 od un reintervento con escissione di tessuto addizionale od 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. Infatti questi dati potrebbero suffragare la teoria della «field cancerization» per la quale si evidenzia un comune clone di origine per aree tumorali geograficamente distinte ma geneticamente correlabili. Pertanto il riscontro in differenti siti di popolazioni clonali di cellule tumorali potrebbe permettere di identificare iniziali eventi responsabili dello sviluppo di secondi tumori, e di selezionare pazienti ad alto rischio di tumori multipli da sottoporre a nuovi approcci terapeutici.

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.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Bedi GC, Westra WH, Gabrielson E, Koch W, Sidransky D. *Multiple head and neck tumors: evidence for a common clonal origin*. Cancer Res 1996;56:2484-7.
- 2 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.
- 3 Califano J, Westra WH, Koch W, Meininger G, Reed A, Yip L, et al. *Unknown primary Head and Neck squamous cell carcinoma: molecular identification of the site of origin*. J Nat Cancer Inst 1999;91:599-604.
- 4 Davidson TM, Nahum AM, Haghghi P, Astarita RW, Saltzstein SL, Seagren S. *The biology of head and neck cancer. Detection and control by parallel histologic sections*. Arch Otolaryngol 1984;110:193-6.
- 5 Davidson BJ, Spiro RH, Patel S, Patel K, Shah JP. *Cervical metastases of occult origin: the impact of combined modality therapy*. Am J Surg 1994;168:395-9.
- 6 Di Nicola V, Resta L, Rotundo L, Fiorella ML, Fiorella R. *Il valore prognostico della valutazione dei margini di resezione nel trattamento chirurgico del carcinoma laringeo*. Acta Otolaryngol Ital 1999;325-41.
- 7 Franco EL, Kowalski LP, Kanda JL. *Risk factors for second cancers of the upper respiratory and digestive systems: a case-control study*. J Clin Epidemiol 1991;44:615-25.

- ⁸ Fried MP, Diehl WH Jr, Brownson RJ, Sessions DG, Ogura JH. *Cervical metastasis from an unknown primary*. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1975;84:152-7.
- ⁹ Magnano M, Bussi M, De Stefani A, Milan F, Lerda W, Ferrero S, et al. *Prognostic factors for head and neck tumor recurrence*. *Acta Otolaryngol* 1995;115:833-8.
- ¹⁰ Mao L, Lee JS, Kurie JM, Fan YH, Lippman SM, Lee JJ, et al. *Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers*. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:857-62.
- ¹¹ Pinel J, Margaloff B, Vilde F, Arkwright S, Le Pajolec CH, Trotoux J. *Les resection limites dans la chirurgie partielle des cancers du larynx*. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 1982;99:325-32.
- ¹² Russolo M. *Correlazione tra stato dei margini di resezione e recidiva locale nella chirurgia del carcinoma laringeo*. *Acta Otolaryngol Ital* 2000;20:395-9.
- ¹³ Sardi I, Franchia A, Ferriero G, Frittelli A, Bruschini L, Montali E, et al. *Prediction of recurrence by microsatellite analysis in head and neck cancer*. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;29:201-6.
- ¹⁴ Snow GB, Annyas AA, van Slooten EA, Bartelink H, Hart AA. *Prognostic factors of neck node metastasis*. *Clin Otolaryngol* 1982;7:185-92.
- ¹⁵ Snow GB. *Evaluation of staging of patients with head and neck Cancer*. In: Meyers EN, Suen JY, eds. *Cancer of the Head and Neck 2nd ed*. Ney York: Churchill Livingstone 1989:17-38.

X. LA STRATEGIA DIAGNOSTICA FINALIZZATA ALL'IDENTIFICAZIONE DEI FATTORI PROGNOSTICI

A. Cavalot, G. Preti, F. Palonta, G. Cortesina

In base a quanto detto nei capitoli precedenti, noi riteniamo necessario che la strategia diagnostica sia allargata a tutti quegli esami, test e visite di altre specialità che possano garantire l'identificazione di quei fattori prognostici di cui abbiamo parlato nei capitoli precedenti e riassunto nella Tabella I del capitolo 8.

LINEE DIAGNOSTICHE GENERALI

Per ogni paziente è necessaria una attenta anamnesi sia fisiologica (abitudini voluttuarie, attività lavorativa ecc.) sia patologica remota e prossima che, orientata dalla sintomatologia, potrà rappresentare una sicura guida per un corretto iter diagnostico ²⁴.

La diagnosi deve essere mirata nei confronti del tumore, delle adenopatie e delle metastasi a distanza. Per quanto concerne il tumore è necessario orientare la diagnosi alla natura e all'estensione della lesione.

La diagnosi di natura si basa sull'esame istologico per lo più di facile realizzazione o, per sedi di difficile accesso, su esame citologico. In lesioni limitate sono da proscrivere le «biopsie exeresi» a meno che si abbia la certezza di avere un margine di tessuto sano tale da assicurare comunque la radicalità dell'exeresi in caso di positività del prelievo.

La diagnosi di estensione è essenziale sia per definire i limiti di T quanto per la valutazione della diffusione linfatica ed in ultima istanza per la programmazione del trattamento. La diagnosi di estensione per T si avvale sia dell'esame clinico, con il supporto di fibre ottiche, ove necessario, quanto di esami endoscopici e dell'imaging (TC, RMN, arteriografia, scintigrafia ecc.). Per quanto attiene l'imaging è necessario ricordare che la TC e la RMN possiedono caratteristiche di risoluzione particolari che le rendono di volta in volta idonee a studiare distretti diversi ^{5 6 23 26}.

La TC spirale permette un'acquisizione particolarmente rapida di molti dati e consente di esplorare la regione interessata in un'unica apnea, riducendo gli artefatti e permettendo l'esecuzione dell'esame anche in pazienti scarsamente collaboranti. Con la TC spirale è inoltre più semplice e più rapida la ricostruzione tridimensionale e quindi lo studio di alcuni distretti quali il massiccio cranio-facciale, o la laringe sottoglottica o le zone di confine con il campo neurochirurgico ^{14 25 28 29}.

Particolare significato, soprattutto per lo studio delle adenopatie metastatiche riveste la PET (tomografia ad emissione di positroni); in tale esame, sfruttando l'aumento dell'attività glicolitica per il glucosio delle cellule neoplastiche, viene usato quale tracciante il desossiglucosio marcato con il fluoro-18 (FDG) che, una volta captato dalle cellule neoplastiche, viene intrappolato senza subire un ulteriore metabolismo, permettendone così la loro visualizzazione. Tale metodica ha dimostrato notevoli possibilità diagnostiche sia per il T quanto per l'N, e anche per lo studio di eventuali recidive anche dopo irradiazione. La sua limitata diffusione, gli alti costi e la ancora scarsa esperienza ne limitano molto l'uso^{7 15 21 22 27}.

Alcuni dati interessanti e a costi inferiori possono essere ottenuti con la scintigrafia al Tallio201, marcatore della neoangiogenesi neoplastica³.

Infine esistono numerosi lavori che evidenziano l'importanza dello studio del linfonodo sentinella, tecnica che ha dato risultati importanti nelle neoplasie mammarie e cutanee (melanomi) (mamelles). Lo scopo della tecnica del linfonodo sentinella è essenzialmente quella di ridurre il numero degli svuotamenti linfonodali non strettamente necessari e valorizzare pertanto l'exeresi selettiva di un linfonodo sentinella identificato mediante una linfoscintigrafia preoperatoria e confermata intraoperatoriamente dalla misurazione mediante gamma camera della radioattività del linfonodo asportato. La positività dello stesso indirizza verso uno svuotamento del collo mentre la sua negatività lo rende facoltativo. Sebbene i dati siano confortanti tale pratica non è ancora di uso corrente, se non in quei centri che hanno sperimentato la metodica¹³.

Questo concetto introduce il tema della corretta valutazione delle adenopatie, essendo la prognosi pesantemente influenzata dalla corretta valutazione e trattamento di N.

L'esame clinico-palpatorio costituisce il primo step, sicuramente economico, ma con sensibilità e specificità variabili e legati a molteplici fattori, non ultimi l'esperienza del clinico, la sede e la conformazione del collo, e si attesta in ultima analisi su un percentuale di falsi positivi superiore al 20% (cNo/pN+).

Per quanto riguarda gli esami strumentali l'ecografia costituisce un'indagine rapida, economica, semplice e ripetibile, con dei limiti legati all'ecostruttura intraghiandolare che spesso non permette la differenziazione tra linfonodo reattivo e metastatico. I dati che grossolanamente indirizzano verso la presunzione di invasione neoplastica sono la dimensione superiore a 1 cm, la forma sferica e l'ipoecogenicità.

La TC e la RMN, come abbiamo già visto, rappresentano due esami indispensabili per la diagnosi di estensione di T, ma sicuramente lo sono anche per la corretta valutazione di N. Così come per l'ecografia, anche per TC e RMN vi sono delle caratteristiche che orientano verso l'interessamento neoplastico di N: la forma sferica, il diametro minimo assiale > 15 mm nella regione sottomandibolare e sottodigastrica e > 10 mm nelle altre regioni, il raggruppamento di più di 3 adenopatie con un diametro assiale minimo di 9-10 mm e l'ipodensità degli stessi.

In caso di N0 clinico non sembra indicata la diagnostica cito-istologica poiché, anche eseguita sotto guida ecografica non può interessare tutti i linfonodi ed ha una sensibilità del 76% e una accuratezza dell'89%; percentuale che aumenta ed ha un suo razionale nelle adenopatie palpabili.

Un discorso particolare riguarda le adenopatie metastatiche da focus ignoto. Studi retrospettivi hanno portato ad alcune significative conclusioni:

- il trattamento radicale del collo può risolvere definitivamente il problema regionale ogni qualvolta le caratteristiche e l'estensione delle metastasi lo consentano;
- il mancato trattamento delle metastasi conduce ad un esito infausto più rapidamente della possibile evoluzione del tumore;
- la neoplasia primitiva può anche non rivelarsi mai o farlo molto tardivamente;
- sembra utile, per la ricerca di T l'uso della PET.

L'iter diagnostico deve essere approfondito e rigoroso, volto innanzitutto a fornire una diagnosi differenziale tra patologia primaria extralinfonodale e patologia linfonodale primaria e secondaria.

Oltre all'anamnesi e alla semeiologia clinica palpatoria e strumentale, va associata in ogni caso la citologia per agoaspirazione evitando sempre la biopsia a cielo aperto. In caso di positività andrà ricercata la lesione primitiva privilegiando, in caso di mancata evidenza clinica, le sedi maggiormente «linfofile», avvalendosi anche di biopsie alla cieca.

Infine è necessario tenere presente la possibilità, non certo eccezionale, di lesioni neoplastiche sincrone o metacrone primitive, con sede e istogenesi diverse. La riconosciuta esistenza della «field cancerization» ci obbliga ad esaminare con i mezzi più opportuni l'intera superficie a maggior rischio.

Oltre all'Rx del torace per la possibile localizzazione brocopolmonare sarà sempre necessario sottoporre il paziente portatore di una neoplasia del distretto cervico-cefalico a panendoscopia per valutare attentamente tutte le VADS. Si dovranno altresì predisporre tutti quegli accertamenti volti a identificare l'eventuale presenza di patologie concomitanti (soprattutto a carico di bronchi, polmoni, fegato, rene): enzimi epatici, bilirubinemia, ecografia epatica, prove di funzionalità renale, Rx torace, prove di funzionalità respiratoria, ev. broncoscopie.

L'esame istopatologico, su biopsia e sui pezzi operatori (volto alla definizione del pTNM), dovrà ricercare: istotipo, grading, pattern d'invasione, embolizzazione intravasale (E+), invasione perineurale, numero e tipo di cellule immunocompetenti, numero e livello dei linfonodi metastatici, rottura capsulare (R+) dei linfonodi.

Vediamo ora in maniera schematica quale deve essere l'approccio diagnostico per sede.

DIAGNOSI PER SEDE

Cavo orale

In tale sede si avvale dell'esame ispettivo e palpatorio, volto a definire in prima istanza le dimensioni reali della lesione e il suo grado di infiltrazione. Per lesioni piccole, senza apparente grave infiltrazione e senza rapporti con strutture ossee tale approccio potrebbe essere sufficiente.

Per lesione maggiori o in cui il rapporto neoplasia/osso può comportare delle scelte terapeutiche anche complesse è necessario avvalersi dell'imaging sia RMN, maggiormente valida per la definizione dell'infiltrazione muscolare, sia TC più esaustiva per quanto concerne l'osso. Lo studio del paziente andrà sempre completato dall'Rx del torace e dalla panendoscopia per i motivi precedentemente descritti.

La biopsia dovrà necessariamente essere praticata per una diagnosi di natura, senza però alterare la configurazione della lesione. Meno significatività sembra avere la colorazione vitale, sebbene in alcuni casi possa essere utile per delimitare i margini macroscopici della lesione ^{12 18}.

Orofaringe

Risulta sovrapponibile tutto ciò che è stato detto per il cavo orale con una maggiore necessità di avvalersi dell'imaging per la valutazione della compromissione muscolare.

In entrambe le sedi è, a nostro avviso, importante il bilancio odontostomatologico per una corretta impostazione terapeutica volta non solo a una eradicazione tumorale ma anche al recupero funzionale post-operatorio ¹¹. Si deve inoltre provvedere a bonifica dentaria (se indicata) prima di una RT post-operatoria.

Rinofaringe

Costituisce sicuramente una delle sedi di più difficile valutazione. La semeiotica è essenziale per identificare i sintomi correlati alla lesione neoplastica (adenopatie, deficit nervosi, epistassi, diplopia, ipoacusia, trisma, faringodinia ecc.)

L'esame clinico con fibre ottiche rigide o flessibili del cavo e la corretta valutazione delle eventuali adenopatie presenti sui primi 5 livelli.

La biopsia sotto guida della fibra ottica è indispensabile per la diagnosi di natura. È consigliabile far precedere la TC e la RMN alla biopsia per due motivi essenziali: l'imaging può rappresentare una guida essenziale per identificare correttamente il punto da biopsiare e secondariamente si evita di interpretare il «minus» lasciato dalla biopsia come una lesione, o di male interpretare l'alterazione dei tessuti conseguente ad edema o sanguinamento.

In casi in cui la sola sintomatologia sia rappresentata dall'adenopatia e non sia visibile una lesione del cavo rinofaringeo, sarà indispensabile un agoaspirato dei linfonodi interessati.

Può avere un significato interessante il dosaggio degli anticorpi anti EBV.

Nei casi più avanzati sarà necessaria una valutazione radiologica del torace e ecografica del fegato.

Come per il cavo orale e l'orofaringe è utile già nell'approccio diagnostico l'apporto dell'odontostomatologo soprattutto per quanto concerne la bonifica dentaria pre-RT quando necessaria per la costruzione di appositi «devices» per ridurre gli effetti collaterali della RT ^{2 4 9}.

Cavità Paranasali

Come per il rinofaringe costituisce una sede di difficile interpretazione, con una sintomatologia spesso sfumata e tardiva, con una diagnosi spesso occasionale, conseguente ad interventi per poliposi nasale e sinusite.

In tale sede risulta determinante l'attenta anamnesi lavorativa volta ad identificare i fattori di rischio correlabili con la patologia in atto (lavoratori del legno, cuoio, etc.).

Considerata la particolare struttura interessata, la valutazione endoscopica non è in grado di darci dei dati precisi riguardo all'estensione della lesione, rimanendo molte zone confinate dentro «camere ossee».

Pure lo studio TC e RMN non sono così dirimenti, dovendo differenziare il tessuto tumorale da quello infiammatorio concomitante, pressoché sempre presente in caso di neoplasia di tale sede.

Inoltre l'indagine radiologica eseguita dopo un precedente trattamento chirurgico per una poliposi o una sinusite rivela sedi di neoplasia, può essere viziata da un tasso importante di falsi positivi conseguenti alla alterazione anatomica post-chirurgica, considerati come rimaneggiamenti secondari a neoplasia. In un paziente non ancora trattato la biopsia andrebbe sempre praticata dopo l'imaging per gli stessi motivi esposti per il cavo rinofaringeo.

Nella valutazione collegiale andrà aggiunto agli altri specialisti anche l'oculista, se si prevede una exenteratio orbitae chirurgica, o se si prevede che il campo di radioterapia possa comprendere il complesso orbita-nervo ottico¹⁰.

Il compito dell'odontostomatologo, oltre a quelli precedentemente ricordati, sarà connesso all'allestimento di una protesi otturatoria nel caso sia necessaria l'asportazione del palato duro e non si pianifichi una ricostruzione chirurgica mediante lembo.

Laringe

La sintomatologia può dare un indirizzo grossolano sulla sede interessata, indirizzando la nostra attenzione sulla regione sovraglottica, glottica o sotto glottica a seconda se il sintomo prevalente è la disfagia, la disfonia o la dispnea²⁴.

La laringe rappresenta una sede facilmente esplorabile con la laringoscopia indiretta mediante fibroscopi rigidi (70°-90°) o flessibili, che permettono di valutare l'aspetto macroscopico della lesione nonché la motilità laringea.

La laringoscopia diretta in narcosi, anche con l'ausilio del microscopio, rappresenta lo step essenziale per l'esecuzione della biopsia e un'accurata visione della lesione. Con tale esame, con l'ausilio di fibre ottiche a 45° è possibile valutare correttamente la regione sottoglottica e le lesioni che interessano la pagina inferiore della corda vocale, sede altrimenti difficilmente valutabile.

L'imaging, sia TC che RMN, manifesta la sua utilità nell'evidenziare l'infiltrazione in profondità, lo sconfinamento dalla regione inizialmente interessata, il coinvolgimento della cartilagine come pure, sedi non altrimenti visualizzabili come lo spazio paraglottico o lo spazio io-tiro-epiglottico.

Tali informazioni sono di vitale importanza nella programmazione terapeutica soprattutto ove si debba scegliere tra un intervento conservativo e uno demolitivo¹⁶.

Ipfaringe

Vale lo stesso discorso fatto per la laringe con un'attenta indagine del canale digestivo. Deve essere condotta routinariamente una esofagoscopia, ove possibile con strumento rigido graduato, e una corretta segnalazione dei limiti inferiori della lesione. È spesso utile eseguire delle microbiopsie anche su mucosa apparentemente indenne a livello della bocca esofagea, tenendo presente la possibilità di forme di early cancer, manifestazioni spesso mal visibili macroscopicamente. Inoltre è utile

ricordare che nel campo dell'imaging costituisce un ausilio validissimo la video-fluorografia, soprattutto in quei casi in cui la disfagia costituisce il sintomo preponderante ma non è correlabile a una lesione evidenziabile.

Ghiandole salivari

Che si tratti di parotide o di ghiandola sottomandibolare, la neoplasia si presenta sempre come una tumefazione, spesso asintomatica, alle volte dolente alla palpazione.

L'ecografia rappresenta l'esame di prima scelta, coniugando elementi vantaggiosi quale la non invasività, il basso costo, la buona risoluzione, la possibilità di essere associata all'agobiopsia.

Presenta il limite di non permettere una buona valutazione delle porzioni al di sotto della mandibola. In questi casi esprime la sua validità la RNM che ha superato la TC per una miglior definizione dei tessuti molli, e sulla localizzazione intrinseca o estrinseca della lesione. Sono in corso i primi studi con la PET che, sebbene interessanti, non permettono, per i limiti noti, di considerare tale esame come un'indagine routinaria⁸.

L'agoaspirato con ago sottile (FNA) è in grado di differenziare le patologie neoplastiche dalle non neoplastiche con un'accuratezza superiore all'80%, permettendo quindi una buona pianificazione della strategia chirurgica. È comunque sempre da proscrivere la biopsia a cielo aperto sia per i rischi di disseminazione di cellule cancerose, sia per i rischi di una possibile lesione nervosa o di fistole salivari²⁰.

RUOLO DEL MEDICO GENERALE PER UNA DIAGNOSI PRECOCE

I tumori delle VADS presentano per il medico di Medicina Generale una comune caratteristica: la possibilità di una diagnosi precoce guidata da una attenta anamnesi e dall'esame clinico, soprattutto per quanto concerne le sedi più frequenti; è evidente quindi l'importanza del suo ruolo per far sì che il paziente giunga all'osservazione dello specialista in una fase precoce.

Il compito del medico di Medicina Generale si estrinseca in due momenti precisi:

– la prevenzione volta all'eliminazione dei fattori di rischio di tipo voluttuario e lavorativo;

– la diagnosi precoce valutando periodicamente i soggetti a rischio per i tumori più frequenti (cavo orale e laringe) con un'attenta analisi delle chiazze discromiche rosse o bianche della mucosa, delle tumefazioni e ulcerazioni, delle adenopatie, della disfagia e disfonia.

È molto importante un confronto continuo con l'équipe specialistica di riferimento per fornire indicazioni univoche, ma anche per contribuire con la propria conoscenza «globale» del paziente, delle sue condizioni generali, delle patologie associate e del contesto socio-ambientale, ad individuare l'iter più adeguato.

Infine il medico di Medicina Generale dovrà porre attenzione all'adesione ad un follow-up corretto, evitando di sottoporre il paziente a procedure diagnostiche inutili e costose.

L'umentato rischio di secondo tumore nei pazienti già affetti da una neoplasia di questo distretto dovrà impegnare il medico di base in un'opera di rafforzamento dell'astensione dai fattori di rischio.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Carrau RL, Myers EN, Johnson JT. *Paranasal sinus carcinoma – diagnosis treatment and prognosis*. *Oncology* 1992;6:43-50.
- ² Cellai E, Olmi P, Chiavacci A, Giannardi G, Fargnoli R, Villari N, et al. *Computed tomography in nasopharyngeal carcinoma. Part II impact on survival*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990;19:1177-82.
- ³ Céruse Ph. *Scintigraphie au thallium 201 dans le diagnostic et le bilan des cancers des VADS*. In: *Problemes peri-therapeutiques des cancers des V.A.D.S. Societe Francaise de carcinologie cervico-faciale*. XXXI Congres, Paris 13-14 Novembre 1998.
- ⁴ Chua DTT, Sham JST, Kwong DLW. *Prognostic value of paranasopharyngeal extension of nasopharyngeal carcinoma. A significant factor in local control and distant metastasis*. *Cancer* 1996;78:202-10.
- ⁵ Curtin HD. *Larynx*. In: Som PM, Curtin HD, eds. *Head and Neck Imaging, ed 3*. St. Louis: Mosby-Yearbook 1996:612-707.
- ⁶ Daniel WW III. *Imaging of laryngeal cancer*. *Otolaryngol Clin North Am* Current concepts in laryngeal cancer 1997;30:35-58.
- ⁷ Ferlin G, Rubello D, Chierichetti F, Zanco P, Bergamin R, Trento P, et al. *Role of fluorine-18-deoxyglucose in the staging and follow-up of oncologic patients: our first experience*. *Tumori* 1997;83:679-84.
- ⁸ Hickman RE, Cawson RA, Duffy SW. *The prognosis of specific types of salivary gland tumors*. *Cancer* 1984;54:1620-4.
- ⁹ Kaasa S, Kragh-Jensen E, Bjordal K, Lund E, Evensen JF, Vermund H, et al. *Prognostic factors in patient with nasopharyngeal carcinoma*. *Acta Oncologica* 1993;32:531-6.
- ¹⁰ Knekt PP, De Jong PC, Van Andel JG de Boer MF, Eykenboom W, Van der Schans E. *Carcinoma of the paranasal sinuses*. *Cancer* 1985;56:57-62.
- ¹¹ Kraus DH, Vastola AP, Huvos G, Spiro RH. *Surgical management of squamous cell carcinoma of the base of the tongue*. *Am J Surg* 1993;166:384-9.
- ¹² Lydiatt D.D, Robbins KT, Byers RM, Wolf PF. *Treatment of stage I and II oral tongue cancer*. *Head Neck* 1993;15:308-12.
- ¹³ Mamelle G. *Technique et interet du ganglion sentinelle dans les tumeurs cutanees de la face. Prise en charge des tumeurs cutanees malignes cervico-faciales*. Matinee d'ORL Carcinologique. Paris 3 Octobre 2000.
- ¹⁴ Maroldi R, Battaglia G, Maculotti P. *Imaging della laringe, dell'ipofaringe e dei linfonodi del collo*. Corso Residenziale avanzato. Sezione di Radiologia del Capo e del Collo della S.I.R.M, Brescia 1998.
- ¹⁵ Mattei R, Rubello D, Ferlin G, Bagatella F. *Ruolo diagnostico della tomografia ad emissione di positroni (PET) con 18-Fluorodesossiglucosio (FDG) nella stadiazione preoperatoria dei tumori del capo-collo: studio prospettico*. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 1998;18:387-91.
- ¹⁶ Million RR, Cassisi NJ. *Management of head and neck cancer. A multidisciplinary approach. 2nd Ed*. Philadelphia: Lippincott Company 1994
- ¹⁷ Molinari R. *Basi scientifiche per la definizione di linee guida in ambito clinico per i tumori: I tumori epiteliali della testa e del collo*. 1999.
- ¹⁸ Molinari R, Banfi A, De Micheli R. *Neoplasie della cavità orale*. In: Bonadonna G, Robustelli della Cuna G, eds. *Medicina Oncologica eds. 5^a Ed*. Milano: Masson 1994:698-704.
- ¹⁹ Molinari R, Banfi A, De Micheli R. *Neoplasie della cavità orale*. In: Bonadonna G, Robustelli della Cuna G, eds. *Medicina Oncologica 5^a ed*. Milano: Masson 1994:685-738.
- ²⁰ O'Brien CJ, Soong SJ, Herrera GA, Urist MM, Maddox WA. *Malignant salivary tumors analysis of prognostic factors and survival*. *Head Neck* 1986:82-92.

- 21 Paulus P, Moreau P, Sambon A. *Contribution of positron emission tomography with 18F-fluorodeoxyglucose to pre-surgical loco-regional lymph node staging of head and neck tumors.* Eur J Nucl Med 1995;22:659-67.
- 22 Rigo P, Paulus P, Kaschten BJ, Hustinx R, Bury T, Jerusalem G, et al. *Oncological applications of positron emission tomography with fluorine-18-fluorodeoxyglucose.* Eur J Nucl Med 1996;23:1641-74.
- 23 Saleh EM, Mancuso AA, Stringer SP. *Relative roles of computed tomography and endoscopy for determining the inferior extent of pyriform sinus carcinoma: Correlative histopathologic study.* Head Neck 1993;15:44-52.
- 24 Sartoris A, Beatrice F. *Prevenzione diagnosi precoce, trattamento conservativo del cancro laringeo.* Federazione Medica 1987:365-374.
- 25 Silverman PM, Zeiberg AS, Sessions RB, Troost TR, Zeman RK. *Three-dimensional imaging of the hypopharynx and larynx by means of helical (spiral) computed tomography.* Ann Otol Rhinol Laryngol 1996;104:425-31.
- 26 Sulfaro S, Barzan L, Querin F, Lutman M, Caruso G, Comoretto R, et al. *T staging of the laryngohypopharyngeal carcinoma.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1989;115:613-20.
- 27 Tombu S, Paulus P, Moreau P, Rigo P. *La tomographie a emission de positrons au 18-fdg (TEP au 18-FDG) dans le suivi des carcinomes epidermoides des V.A.D.S. Problemes peri-therapeutiques des cancers des V.A.D.S. Societe Francaise de carcinologie cervico-faciale. XXXI Congres, Paris 13-14 Novembre 1998.*
- 28 Vannier MW, Gado MH, Marsh JL. *Three-dimensional display of intracranial soft tissue structures.* Am J Neuroradiol 1983;4:520-1.
- 29 Zinreich SJ, Mattox DE, Kennedy DW, Johns ME, Price JC, Holliday MJ, et al. *3-D CT for cranial facial and laryngeal surgery.* Laryngoscope 1988;98:1212-9.

XI. CORRELAZIONE TRA FATTORI PROGNOSTICI E TRATTAMENTO IN ONCOLOGIA CERVICO-CEFALICA

R. Boggero, F. Palonta*, G. Preti*, P. Rosso*, F. Beatrice**, R. Albera*, G. Cortesina*, C. Giordano

L'identificazione di fattori prognostici (clinici, patologici e biologici) sicuri o probabilmente sicuri è un grosso passo avanti nella valutazione clinica del paziente portatore di HNSCC, in una visione oncologica moderna, che prevede valutazioni diagnostiche più sofisticate e avanzate che si vengono necessariamente a correlare con indicazioni terapeutiche spesso multimodali e integrate. L'entrare nella logica di ricercare sempre i fattori prognostici più sicuri o almeno quelli che non richiedono tecnologie di biologia molecolare sofisticate (non a disposizione di tutti i centri) e di predisporre una sorta di «cartella dei fattori prognostici» significa aprire la porta, previa valutazioni auspicabilmente collegiali con radioterapista, patologo e oncologo medico, a trattamenti integrati, il cui obiettivo è quello di migliorare il controllo locale, la sopravvivenza e, se possibile, la qualità della vita.

Riteniamo valida la classificazione dei fattori prognostici fatta in un capitolo iniziale (legati al paziente, alla neoplasia e alle modalità di trattamento) ed a questo rimandiamo. In questa sede cercheremo di valutare i vari tipi di trattamento oggi a nostra disposizione e la loro integrazione, per valutare come singole indicazioni terapeutiche possano essere strettamente condizionate da singoli fattori prognostici (negativi o positivi) e per cercare di definire una specie di protocollo che possa essere utilizzato nella valutazione dei singoli casi. Strettamente legate alla presenza di fattori prognostici saranno inoltre le modalità di follow-up che dovrà essere necessariamente più accurato, più frequente e più prolungato in caso di presenza di fattori prognostici negativi.

Esamineremo, in modo generale (cioè per tutti gli HNSCC) i vari tipi di trattamento a nostra disposizione e cioè chirurgia (demolitiva e conservativa), radioterapia, radio-chemioterapia, immunoterapia cercando di analizzare l'indicazione tenendo conto dei fattori prognostici.

CHIRURGIA

Prenderemo in considerazione separatamente la chirurgia conservativa e la chirurgia demolitiva.

I Clinica ORL, Università di Torino;

* II Clinica ORL, Università di Torino;

** Divisione ORL, A.S.O. «S. Giovanni Bosco» di Torino

Chirurgia conservativa

È concetto di base che non deve mai essere dimenticato, che preservare una parte di organo (e quindi una funzione) non deve mai, in modo assoluto, andare a scapito del controllo locale, sia sul T che sull'N.

Il fattore prognostico T clinico sia nei suoi aspetti anatomico patologici macroscopici (vegetante, infiltrativo, ulcerato e forme intermedie), sia nel suo coinvolgimento delle varie sedi e sottosedi della regione (in termini di numero e tipo delle sedi interessate) è sicuramente il fattore più importante che deve essere valutato con estrema cura.

La nostra indicazione dovrà necessariamente tener conto della necessità vitale di avere margini chirurgici adeguati (e cioè negativi) facendo largo uso degli esami istologici estemporanei al criostato congelatore e di non resecare sedi, la cui presenza è indispensabile per il ripristino di una corretta funzione.

Questo discorso è particolarmente importante per la laringe, dove le opzioni conservative sono numerose, ma lo è anche per cavo orale e orofaringe, dove il risparmio di una sede o meno, ci permette ricostruzioni funzionali (anche con lembi plastici ricostruttivi) più adeguate sia dal punto di vista estetico che di quello funzionale.

Lo studio dei margini sul pezzo operatorio dovrà essere molto accurato e richiede una competenza e accuratezza specifica da parte del chirurgo soprattutto nell'orientamento corretto degli «specimens» chirurgici da presentare al patologo. Dovranno essere ricercati, oltre ad eventuali focolai neoplastici, aree di displasia o alcune alterazioni molecolari di cui si è parlato nell'apposito capitolo.

Quest'ultima ricerca sarà ovviamente possibile soltanto in quei centri che possiedono strutture di laboratorio idonee a questo obiettivo (che noi potremmo qui chiamare centri di 2° livello). La presenza di cellule neoplastiche nei margini (margini positivi) o anche solo di displasia grave (early cancer) dovrà di necessità far indicare una radioterapia post-operatoria a dosi quasi piene (60-65 Gy) secondo un protocollo, ancora in uso, dell'IGR – Villejuif (Paris)^{75 86 101 113}. Secondo tale protocollo i criteri di una RT post operatoria sono così schematizzabili:

- 1) N+, R-, E-: 50/55 Gy;
- 2) N+, R+, E-: 60 Gy;
- 3) N+, R+, E+: 65 Gy;
- 4) Margini positivi per tumore: 60-65 Gy.

L'esame istologico del tumore (bioptico e pT) dovrà essere fatto con tecniche istologiche tradizionali per una valutazione corretta del grading, il cui significato prognostico non è universalmente accettato ma che può decisamente essere orientativo, in caso di grading molto indifferenziato. Ad esse potranno essere affiancate tecniche immunoistochimiche con A.M. per la valutazione di indici proliferativi (es. Ki 67) o tecniche di cinetica cellulare (T pot e altre). Queste ultime, se eseguite sulla biopsia, potrebbero darci un certo orientamento sulla scelta di una radioterapia esclusiva: sono stati anche tentati studi clinici controllati per verificare questo modo di procedere, con risultati però non decisivi. La ricerca, con tecnica immunoistochimica e A.M., di alterazioni di molecole di adesione, si è rilevata predittiva per metastatizzazione linfonodale, e quindi potrebbe essere affiancata (qualora lo specimen sia volumetricamente sufficiente) alle tecniche precedenti ed è alla portata di ogni laboratorio. La ricerca molecolare di oncogeni, oncogeni soppressori e di al-

cune proteine effettrici, del cui significato prognostico si è discusso in un capitolo precedente, potrà essere intrapresa solo sul pezzo operatorio (per una questione esclusivamente di volume) qualora il centro abbia tutte le strutture (in termini di apparecchiature e personale tecnico e biologo) che possano dare sufficienti garanzie per la ricerca molecolare.

È comunque chiaro che la presenza, a livello di biopsia, di fattori a cui viene attribuito un significato prognostico negativo (di sicurezza o di probabilità) dovrà essere considerata insieme, in una valutazione globale la più critica possibile, con il T clinico e dovrà necessariamente, in presenza di un T clinico «borderline» per l'indicazione di chirurgia conservativa, limitare l'indicazione di quest'ultima. Ne deriva il concetto che una specie di «bilanciamento critico» di alcuni fattori prognostici, può portare ad una più oggettiva scelta «personalizzata» di un tipo di trattamento chirurgico e ne deriva altresì il concetto che la presenza, al pT, di fattori patologici o biologici negativi (sufficientemente sicuri) deve per lo più indicare una RT post-operatoria (40-45 Gy) pur tenendo conto che questa, soprattutto se eseguita dopo chirurgia conservativa della laringe, potrebbe per questioni di edema e mucositi post-attiniche, essere di ostacolo ad una buona ripresa funzionale (soprattutto per la deglutizione).

I fattori prognostici legati al paziente (di cui si è parlato in un precedente capitolo) (età, sesso, familiarità, patologie concomitanti, abitudini voluttuarie e performance status) devono anch'essi essere valutati con attenzione prima di indicare una chirurgia conservativa (soprattutto laringea).

Un'età avanzata, con paziente anziano in cattive condizioni generali, dovrà controindicare un intervento conservativo, e così pure la presenza di gravi patologie concomitanti di sicuro cattivo significato prognostico (con particolare riguardo a gravi bronco-pneumopatie croniche, che potrebbero venire aggravate da una difficoltosa ripresa della deglutizione). Una performance status decisamente scadente o il permanere di abitudini voluttuarie nocive (es. fumo e alcool) dovranno essere attentamente valutati e dovranno indurre a prudenza in un'indicazione di tipo conservativo.

Chirurgia demolitiva

Questo tipo di chirurgia è quasi sempre indicata, anche in presenza di un valore prognostico negativo dei fattori considerati nelle righe precedenti: la moderna chirurgia plastico-ricostruttiva, che si avvale di lembi miocutanei, di lembi liberi rivascolarizzati di vario tipo, di interposizione di visceri (peduncolati o rivascolarizzati) ha reso operabili tumori che solo 20 anni fa erano inoperabili, con sufficientemente buoni risultati sia dal punto di vista del ripristino funzionale che di quello estetico. Soltanto cattive condizioni generali del paziente (soprattutto per quanto riguarda gravi patologie concomitanti) o una previsione di sopravvivenza particolarmente infausta con concomitante previsione di cattiva qualità di vita, possono (e talora debbono) indurre ad astensione chirurgica e ad una scelta di terapie palliative. Occorre qui sottolineare come l'affermarsi della chirurgia plastico-ricostruttiva ha notevolmente migliorato le possibilità (aumentandone quindi le indicazioni) della chirurgia demolitiva. Tutto ciò accade soprattutto per quanto riguarda la chirurgia del cavo orale, dell'orofaringe, dell'ipofaringe e del sistema naso-sinusale. Nella

Tabella I sono riportati in sintesi i vari lembi (pedunculati o liberi rivascularizzati) e i visceri per interventi di interposizione, oggi usati, con un certo successo, nella chirurgia demolitiva delle sedi sopracitate.

È ovvio che avendo il chirurgo la certezza di avere «stoffa aggiuntiva» che può usare, con una certa facilità, per riparare estese perdite di sostanza, egli potrà essere più disinvolto nella demolizione, aumentando quindi la probabilità di avere margini negativi ed un migliore controllo locale.

FATTORI PROGNOSTICI E INDICAZIONI DI UNO SVUOTAMENTO LINFONODALE CERVICALE IN N0 CLINICO

I fattori di uno svuotamento funzionale del collo (o di uno svuotamento selettivo) profilattico in N0 si basano sul fatto che vari studi anatomo patologici hanno dimostrato che linfonodi di colli in N0 clinico sono risultati essere sede di micrometastasi in una percentuale oscillante tra il 30% e il 50% dei casi ¹²³. Questa percentuale potrebbe aumentare se si approfondissero gli studi con tecniche molecolari: in ricerche personali infatti abbiamo osservato che linfonodi indenni da micrometastasi se studiati con tecniche istologiche tradizionali, erano talora sede di mutazione dell'oncogene MET (sempre assente nei linfonodi normali) quando venivano studiati con tecniche proprie della biologia molecolare ^{27 32}. Allo stato attuale delle conoscenze la scelta di uno svuotamento profilattico in N0 clinico, è ancora una scelta valida, perché razionale, e perché uno svuotamento funzionale o selettivo del collo non è intervento così pericoloso o mutilante. Si deve qui ricordare che alcuni AA preferiscono, a questo proposito, una RT profilattica del collo N0 ¹¹, o una politica «wait and see» con trattamento di necessità alla comparsa di metastasi ⁶³. È ovvio però che se dalle evidenze delle ricerche molecolari o di quelle riguardanti il linfonodo sentinella ci giungono messaggi di fattori predittivi per la metastatizzazione, sarà doveroso in futuro, tenerne conto nella programmazione della strategia chirurgica, anche se ciò dovesse complicare, in termini di tempo, tecnologie e conseguenti costi, i cosiddetti percorsi diagnostici. È un problema comunque al momento aperto, in quanto non esistono ad oggi studi prospettici significativi che dimostrino la maggior validità di una scelta strategica rispetto all'altra.

L'immunologia dei tumori non è stata in grado di dirci se, a tumore in fase iniziale corrisponda un precoce coinvolgimento linfonodale, e se il linfonodo abbia esercitato sulle cellule tumorali una valida azione di filtro, oppure se tale azione sia stata incompleta, con una sorta di «congelamento» delle cellule tumorali nel tessuto linfatico, pronte però a diventare, in condizioni particolari, potenzialmente evolutive, con meccanismi di metastatizzazione che sono stati descritti in un apposito capitolo (a cui rimandiamo). La ricerca moderna si è rivolta allo studio di fattori biologici e molecolari che, a parità di stadiazione clinica, siano segno certo di maggiore aggressività del tumore, soprattutto per quanto riguarda la metastatizzazione.

L'approccio più moderno riguarda lo studio di marcatori genetici, oncogeni e oncosoppressori che, una volta attivati potrebbero conferire alla cellula tumorale una maggiore potenzialità metastatica. Gli studi più significativi riguardano il gene bcl-1 (che codifica la ciclina D1), l'oncosoppressore p53, il gene bcl-2, la regione cromosomica 11q13, il gene EGFR e le molecole di adesione.

In 4 lavori importanti^{34 81 89 97} si dimostra con una buona significatività statistica (in analisi multivariata) e su casistiche numerose, che una amplificazione della regione 11q13 e del gene bcl-1 si correla con la presenza di metastasi linfonodali in HNSCC. Cortesina et al.⁹⁴ hanno inoltre dimostrato, in uno studio immunohistochimico condotto su carcinomi della laringe (80 casi) che la perdita di polarità e la disorganizzazione spaziale di alcune integrine con la contemporanea frammentazione dei corrispondenti ligandi si correla, con buona significatività statistica, con la metastatizzazione linfonodale.

Più esigui sono invece i dati della Letteratura a proposito di p53 e bcl-2: in ogni caso però queste ricerche, condotte su carcinomi laringei, dimostrano che l'iperespressione di p53 e bcl-2 si correla significativamente con presenza di metastasi. Maurizi et al.⁷⁸ infine in 140 casi di carcinoma laringeo hanno osservato che l'espressione del gene EGFR si correla significativamente con la metastatizzazione linfonodale.

I moderni studi sul linfonodo sentinella negli HNSCC hanno aperto una nuova via che, se verificata su casistiche più numerose, potrebbe diventare strumento di routine clinica prima di indicare uno svuotamento profilattico del collo in N0 clinico.

Pastore et al.⁹⁵ in un gruppo di 20 pazienti portatori di carcinoma del cavo orale e dell'orofaringe, hanno dimostrato l'affidabilità di una tecnica linfoscintigrafica con Tecnezio-99m (iniettato in sede perilesionale 18 ore prima dell'intervento), con verifica intraoperatoria dei linfonodi positivi, e osservato una buona correlazione tra linfonodi positivi alla linfoscintigrafia e reperti istopatologici del pN. Risultati abbastanza simili sono stati ottenuti da Ionna et al.⁶⁰ in uno studio analogo condotto su 41 casi di carcinomi del cavo orale.

I dati biomolecolari sopradescritti presentano sicuramente una buona affidabilità, mentre sono sicuramente promettenti i dati linfoscintigrafici. L'unico problema è rappresentato dalla fattibilità di questi tests in una strategia diagnostica di routine.

Per la biologia molecolare (che deve essere fatta di necessità su biopsie) c'è un problema di base di volume del materiale prelevato: prelievi troppo piccoli (che purtroppo sono frequenti) rendono impensabile uno studio molecolare con la PCR. Si potrebbe identificare il volume minimo necessario in un diametro di 1 cm.

C'è poi un problema di attrezzature, personale tecnico e costi, che non rendono praticabili queste tecniche avanzate in tutti i centri in cui si operano gli HNSCC: questo è comunque un problema complesso, che analizzeremo in un successivo apposito capitolo.

FATTORI PROGNOSTICI INDICATORI DI RADIO E CHEMIO-SENSIBILITÀ

È concetto storicamente consolidato dell'oncologia clinica che il T è più radiosensibile dell'N (specie se N2 o N3), e che un T vegetante di piccole-medie dimensioni è più radiosensibile di un T infiltrativo e di grandi dimensioni. Si è identificato in un diametro al di sotto dei 2-3 cm il «cut off volumetrico» entro il quale è possibile indicare, con buone probabilità di successo una RT esclusiva^{10 53}. Questo criterio puramente clinico è però superficiale, in quanto è dato osservare tumori piccoli e vegetanti radio o radio-chemioresistenti, il che fa pensare che i problemi so-

no più profondi della pura clinica, e che verosimilmente sono di tipo biologico e molecolare. È noto che RT e CT inducono un danno a carico del DNA determinando apoptosi (morte cellulare programmata), meccanismo regolato da alcune funzioni geniche, in via di definizione: ed essendo stata dimostrata l'esistenza di geni che favoriscono l'apoptosi (pro-apoptotici) accanto a geni che la inibiscono (anti-apoptotici), si può pensare ad una prevalenza di questi ultimi per spiegare un fallimento radio o radio-chemioterapico.

Sono stati identificati parametri biologici e molecolari di radio-chemio sensibilità.

Tra i parametri biologici è stato dimostrato che un'aberrazione della DNA ploidia (aneuploidia) si correla con una maggiore radiosensibilità, risultando nelle cellule aneuploidi meno efficienti i meccanismi di riparazione del danno al DNA radio indotto^{41 49 50 121}. È stato proposto un DNA index per selezionare, negli HNSCC, cellule radioresistenti a prognosi cattiva. È stato inoltre studiato un test (cosiddetto dell'SF2 tumor surviving fraction a 2 Gy) per identificare cellule radioresistenti: esso valuta in vitro, su materiale biotipico coltivato in agar, la percentuale di cellule in grado di sopravvivere e replicarsi per 6 cicli mitotici dopo esposizione ad una dose radiante di 2 Gy^{8 19}. Sono stati usati, per lo stesso scopo, K67, T pot e molecole di adesione (integrine, caderine e laminine) con risultati talora contrastanti e di carattere preliminare (degni tuttavia di essere sviluppati).

Tra i parametri molecolari si è osservato che i geni p53, bcl-2, bax, geni mediatori dell'angiogenesi, EGFR e Cox-2 possono essere coinvolti nei meccanismi di radio-chemiosensibilità.

In un trattamento radioterapico, che ha come meccanismo d'azione essenziale una induzione di apoptosi^{42 74}, un'alterazione di p53, che è un gene oncosoppressore che favorisce l'apoptosi, può essere causa di radioresistenza. Ci sono evidenze in questo senso negli HNSCC^{3 44 45 66 97}.

In alcuni di questi lavori è stata studiata, accanto alla p53, anche la bcl-2 ed è stato osservato che l'iperespressione di bcl-2 si correla con una ridotta radio-chemiosensibilità, mentre risultati opposti dà l'iperespressione di p53.

L'associazione p53 mutata (m p53) con iperespressione di bcl-2 (bcl2+) è un segno abbastanza certo di radio-chemioresistenza^{33 115 122}. Risultati preliminari si hanno in 2 lavori sul bax (gene pro-apoptotico): la transfezione genetica da cellule normali a cellule di carcinoma squamoso resistenti alla CT, in topi, trasforma la chemio-resistenza in chemio-sensibilità. In altri 2 lavori, in cui si è studiato EGFR^{28 129}, è stato osservato in 109 HNSCC, che l'iperespressione di EGFR si correla con una minore chemio-sensibilità. Alcuni studi infine hanno dimostrato che un elevato grado di angiogenesi si correla con una minor radio-chemiosensibilità^{47 48 52 77 103 128 134}.

Sempre a riguardo dell'angiogenesi Milas et al.⁸² hanno evidenziato nel topo che l'inibizione di Cox2 riduce la capacità angiogenetica migliorando la risposta al trattamento radiante.

Concludendo si può affermare che lo studio di alcuni di questi parametri biologici e molecolari, almeno quelli per cui esiste un numero maggiore di evidenze negli HNSCC, può incominciare a essere introdotto in centri con le adeguate attrezzature e personale tecnico-biologo, prima di indicare una scelta di radioterapia o radiochemioterapia esclusiva. Una particolare attenzione va oggi rivolta ai criteri di

scelta di un'associazione radio-chemioterapica, che rappresentano il risultato di una serie di studi di epoca abbastanza recente. Riteniamo opportuno qui analizzare le basi razionali e sperimentali di tale associazione.

L'integrazione tra la RT e la CT negli stadi localmente avanzati può:

1) migliorare l'andamento della malattia riducendo la quota di fallimenti loco-regionali ed incrementando la percentuale di sopravvivenza;

2) sterilizzare le eventuali micrometastasi che, seppur non frequenti, possono rappresentare una causa di morte, (in questi pazienti l'incidenza di metastasi a distanza, clinicamente rilevabili è del 5-15%);

3) ridurre l'entità della demolizione chirurgica o tentare di preservare l'organo sede di neoplasia. Lo studio del Department of Veterans Affairs Cooperative Studies Program (VACSP) sul carcinoma della laringe ha dato risultati positivi in tal senso con una percentuale di conservazione dell'organo in oltre il 60% dei casi trattati, senza compromissione della sopravvivenza.

I meccanismi attraverso i quali l'interazione tra farmaci e radiazioni può esplicarsi sono molteplici:

1) miglior diffusione del farmaco nel tessuto tumorale in conseguenza della riduzione della massa neoplastica indotta dalla RT;

2) miglioramento delle condizioni di ipossia a livello del tumore quale conseguenza della riduzione del volume neoplastico indotto dalla RT;

3) sincronizzazione cellulare indotta dall'irradiazione;

4) sincronizzazione cellulare indotta dai farmaci, il che rappresenta un evidente vantaggio al fine di migliorare l'efficacia della RT frazionata;

5) incremento del danno iniziale radioindotto per inibizione dei fenomeni di riparazione del danno, sia subletale, sia potenzialmente letale, per effetto del farmaco;

6) la CT è in grado di variare la frazione di crescita cellulare;

7) la CT riduce la quota di cellule staminali;

8) per alcuni farmaci è stato ipotizzato un vero effetto radiosensibilizzante.

La sequenza con la quale la RT e la CT possono essere combinate determina differenti forme di integrazione: neoadiuvante, concomitante e adiuvante.

La simultanea somministrazione di farmaci e radiazioni ionizzanti (CT concomitante) è stata suggerita dalla possibilità di ottenere il massimo effetto sul controllo locoregionale e, secondariamente, sulle micrometastasi. In effetti, tale integrazione consente di limitare il tempo totale di trattamento, con notevole vantaggio sul piano della dose/intensità, vale a dire della quantità di farmaco somministrato per unità di tempo, espressa in $\text{mg}/\text{m}^2/\text{settimana}$, indipendentemente dallo schema di somministrazione. Il maggior svantaggio del trattamento simultaneo può essere rappresentato dal possibile incremento di tossicità a carico dei tessuti sani: da questo deriva la necessità di scegliere un farmaco la cui tossicità non sia cumulabile con quella della RT.

I trials clinici che hanno utilizzato associazioni di CT alla terapia convenzionale sono numerosi; differiscono tuttavia per tipo di associazione, schema di CT adottato e per sedi di malattia.

La meta-analisi di El-Sayed ³⁶ ha analizzato 42 studi prospettici randomizzati per un totale di 5.583 pazienti, che confrontano trattamenti integrati chemio-radio-terapici (neoadiuvante, concomitante e adiuvante) con i trattamenti loco-regionali definitivi. I risultati dimostrano un significativo aumento della tossicità indotta dai

trattamenti integrati. Tuttavia, si osserva anche un miglioramento della risposta a breve termine e del controllo locale della malattia a due anni a favore delle associazioni CT-RT; globalmente si osserva una riduzione della mortalità dell'11% che diventa il 22% quando vengono presi in considerazione i soli studi che associano CT e RT in modo concomitante.

Questi risultati sono confermati dalla meta-analisi di Pignon ⁹⁸ su 63 trials e 10.741 pazienti, dove si dimostra che non vi è beneficio in termini di sopravvivenza quando la CT è somministrata in modo neoadiuvante o adiuvante, mentre si ottiene un incremento della sopravvivenza a 5 anni del 4% quando la CT è concomitante o alternante alla RT.

FATTORI PROGNOSTICI E INDICAZIONI DI TERAPIE ADIUVANTI A CHIRURGIA: RADIOTERAPIA POST-OPERATORIA E IMMUNOTERAPIA (NEO-ADIUVANTE E ADIUVANTE)

Nei casi in cui, dopo chirurgia conservativa o demolitiva, c'è un ragionevole dubbio di un mancato controllo locale e della presenza di una minimal residual disease (m.r.d.) è sempre indicata una RT post-operatoria che ha l'obiettivo di «sterilizzare» la m.r.d. Lo stesso discorso va fatto se esistono fattori prognostici che indicano un'alta probabilità di metastatizzazione linfonodale.

Elenchiamo qui una serie di fattori clinici, patologici (che derivano dal pTNM) e molecolari (ancora in via di definizione) che stanno alla base dell'indicazione di una RT adiuvante (post-operatoria).

Tra i fattori clinici è ormai prassi consolidata di individuare in tutti i T4 e nei T3 N2, N3 situazioni indicanti di necessità la RT post-operatoria.

Tra i fattori patologici sono ormai consolidate una serie di evidenze istologiche, che derivano dal pTNM:

- 1) presenza di embolizzazione intravasale (E+) nel tumore primitivo;
- 2) aspetti istologici basaloidi del carcinoma squamoso;
- 3) grading indifferenziato (dubbio, e quindi valido solo se associato ad altri fattori prognostici negativi);
- 4) invasione perineurale del tumore;
- 5) metastatizzazione in più di 3 linfonodi della catena asportata chirurgicamente;
- 6) rottura capsulare (R+), che è quasi sempre presente in casi di N3 ed N2;
- 7) margini chirurgici positivi per cellule neoplastiche. È questo il caso più sicuro della presenza di una m.r.d.: la mancata eradicazione chirurgica completa (che ne è il presupposto) costituisce la principale causa di morte negli HNSCC con una probabilità di recidiva loco-regionale intorno al 50% dei casi, quando la positività del margine è stabilita con tecnica istologica tradizionale.

La più recente ricerca, applicando tecniche molecolari, ha instillato «il ragionevole dubbio» che la negatività dei margini studiati con tecniche tradizionali, dia l'assoluta certezza di un buon controllo locale, con dati che supportano l'ipotesi che debba essere rivisto il concetto di «tessuto cosiddetto sano» per la presenza di markers molecolari che mettono fortemente in dubbio il concetto stesso. È oggi ri-

conosciuto che in un'area esposta ai carcinogeni si possono verificare alterazioni genetiche (oncogeni, oncosoppressori, proteine effettrici) a carattere multifocale, o a cascata nel tempo, per cui una zona di tessuto sano (es. un margine istologicamente negativo) sede di alterazioni molecolari, non può più essere considerata scevra da rischi oncologici. È questa in fondo la conferma molecolare della vecchia teoria di Slaughter (1953)¹¹⁷ della «Field cancerization». Un importante studio americano¹⁴, confermato da studi successivi^{76 120 127}, ha dimostrato che la presenza di p53 mutata nei margini istologicamente negativi con le stesse caratteristiche mutanti della p53 evidenziata nel tumore e nei linfonodi metastatici (asportati chirurgicamente), è fattore prognostico biologico negativo nel predire la recidiva loco-regionale. Questi concetti sono stati confermati, in via ancora preliminare da Gallo¹¹², per cui si può incominciare a parlare di una positività molecolare dei margini, che è caratterizzata dalla presenza nei margini stessi delle medesime mutazioni del marker reperito nel tumore primitivo e nella metastasi: questo fatto si correla con un significativo aumento di recidive. Oltre alla p53 mutata è stato osservato un coinvolgimento del proto-oncogene IF4E^{91 92} la cui presenza in margini istologicamente negativi si correla, in HNSCC, significativamente ($p = 0,002$) con la comparsa di recidive loco-regionali. Questo studio però è stato condotto su un esiguo²⁶ numero di casi, e merita pertanto conferme.

Concludendo si può affermare che lo studio patologico del pezzo operatorio (che porta alla definizione del pTNM) deve essere fatto con la massima cura e precisione e che questo richiede una «collaborazione competente» del chirurgo soprattutto per quanto riguarda le operazioni di orientamento dei pezzi e l'uso delle sostanze fissanti. Si può altresì affermare che, in centri con attrezzature tecniche e di personale biologo, è auspicabile che si approfondisca, portandolo verso la routine, lo studio della p53 mutata per la quale le evidenze sembrano già molto oggettive.

La valutazione finale dei fattori prognostici clinici, patologici, biologici, deve essere fatta collegialmente (da chirurgo, radioterapista, oncologo medico, anatomopatologo) per stabilire, in base ad essi, un programma di integrazione terapeutica.

A completamento di questo capitolo, desideriamo esporre i risultati di uno studio randomizzato del nostro gruppo³⁰ recentemente pubblicato in cui sono stati studiati, su 220 casi di carcinomi squamosi del cavo orale e dell'orofaringe in stadio III, IV gli effetti dell'integrazione terapeutica con Interleuchina 2 (IL2) a bassa dose (5000 UI) iniettata nella catena linfonodale satellite del T prima dell'intervento (10 giorni prima) e dopo l'intervento nella catena linfonodale residua controlaterale per 5 giorni al mese per 12 mesi.

I casi selezionati erano casi in stadio III, IV e tutti gravati da fattori prognostici negativi clinici e patologici, e pertanto trattati tutti con chirurgia + RT post-operatoria.

Il braccio trattato con lo schema IL2 + chirurgia + RT + IL2, rispetto al braccio trattato con chirurgia + RT, ha avuto una sopravvivenza NED significativamente migliore ($p < 0,04$) e un minor numero di recidive ($p < 0,01$). Condizione indispensabile di base, per poter applicare questo schema integrato, è il mantenimento di una catena linfonodale residua dopo chirurgia: pertanto tale trattamento può essere usato soltanto in quei tumori rigidamente lateralizzati per cui è sufficiente uno svuotamento linfonodale monolaterale.

Le correlazioni esistenti tra fattori prognostici e scelte terapeutiche, uni o multimodali, che abbiamo analizzato nelle pagine precedenti riguardano gli HNSCC in generale. Ci sembra però qui doveroso ultimare il capitolo mettendo a fuoco i problemi specifici di ogni singola sede.

CAVO ORALE

Nel cavo orale hanno significato prognostico differente le singole sottosedì, ed è stata ben identificata una sopravvivenza decrescente in N0 (nell'ordine) nei tumori del labbro, pelvi orale anteriore, gengiva, bordo lingua (1/3 medio), pelvi orale laterale, 1/3 posteriore bordo lingua, palato duro, per cui nelle sedi con peggior prognosi è sempre indicato un follow-up più «stretto» e accurato, e aumentano le probabilità, in concomitanza con altri fattori negativi, di dover indicare un'integrazione terapeutica^{35 71 102}. Se l'intervento chirurgico ha preservato una catena linfonodale, noi usiamo l'immunoterapia con IL2 loco-regionale secondo le modalità descritte³⁰. In caso di interessamento mandibolare da parte del tumore è indicata la demolizione mandibolare^{6 20 71 102 131}, che non riduce le possibilità di controllo locale¹¹⁰.

In tumori a localizzazione anteriore, con T vegetante e «piccolo» (entro 3 cm) è indicata bradicurie terapia interstiziale (BRT) con Iridio 131: occorre però che il T sia distante almeno 1 cm dall'osso^{57 73 132}.

In tumori «piccoli» e vegetanti del labbro (Tis, T1, T2 N0) si sono avuti risultati sovrapponibili a quelli ottenuti con chirurgia e BRT, con l'impiego della terapia fotodinamica, che dà minori compromissioni funzionali ed estetiche ed è passibile di recupero chirurgico di «rattrapage»^{31 69}.

Nei tumori più avanzati (Stadio III, IV) valgono gli stessi concetti precedentemente esposti a proposito degli HNSCC, che prevedono chirurgia demolitiva + chirurgia plastico-ricostruttiva + RT post-operatoria (per la presenza quasi costante di fattori istologici e biologici negativi nel pTNM)^{54 58 61 100}. In pazienti non operabili (per estensione del T o per condizioni generali scadenti) l'unica opzione è la radiochemioterapia che può, talora, permettere una chirurgia di recupero^{18 39 54 84 96 114}.

OROFARINGE

Un T «piccolo» (< 3 cm) e vegetante (T1, T2 piccolo), può rappresentare l'indicazione per un trattamento radioterapico esclusivo per via trans-cutanea o per una BRT, applicando alla chirurgia il ruolo di «rattrapage» in caso di mancato controllo locale o recidiva. Per quanto riguarda la RT esclusiva, i risultati migliori si sono ottenuti con un frazionamento a dosi bi-giornaliere, e la risposta completa, molto frequente soprattutto negli stadi iniziali, è risultata essere un ottimo fattore prognostico per la sopravvivenza^{55 87}.

Negli stadi più avanzati, oltre all'indicazione prevalente di Chirurgia (con lembi ricostruttivi) + RT post-operatoria (quasi sempre indicata vista la frequentissima presenza di fattori a prognosi negativa) alcuni AA hanno ottenuto buoni risultati con protocolli di radio-chemioterapia concomitante, con possibilità di «rattrapage» chirurgico^{21 64 80 130}; l'iper-frazionamento della RT ha in alcuni casi migliorato, in que-

sti protocolli, i risultati di sopravvivenza¹⁵, e così pure l'associazione dei taxani alla RT accelerata^{16 38 126}.

Non abbiamo parlato, fino ad ora, di chemioterapia neo-adiuvante, in passato molto usata sia nel cavo orale che nell'orofaringe: recenti studi di metanalisi condotti su ampie casistiche e con metodi statistici sofisticati⁹⁸ hanno dimostrato, pensiamo in via definitiva, che la CT neo-adiuvante non ha alcun impatto sulla sopravvivenza, per cui riteniamo che non debba oggi essere più praticata: essa ha inoltre lo svantaggio di ritardare il trattamento base (chirurgico o radioterapico) e, in caso di risposta clinicamente (e non istologicamente) completa di indurre il paziente a rifiutare questi successivi trattamenti, con risultati molto negativi.

RINOFARINGE

Il trattamento dei carcinomi del rinofaringe è sempre un trattamento radiante che riserva alla chirurgia un ruolo di recupero sulle catene linfonodali in caso di persistenza o ripresa di malattia⁴. Sono state studiate, con buoni risultati, le associazioni di radioterapia + polichemioterapia concomitante¹⁴⁶ per cui è ancora in discussione la sequenzialità ottimale dei 2 trattamenti^{2 23 111}. Sono state via via sperimentate chemioterapia neo-adiuvante e RT^{24 25 59 133}, quella adiuvante e RT¹⁰⁷ e quella concomitante¹² che sembra dare risultati migliori.

In ogni caso, nei carcinomi del rinofaringe, non esistono, a oggi, fattori prognostici utilizzabili per indicare un protocollo invece di un altro, per cui, a nostro avviso, deve valere, nella scelta terapeutica, la maggior esperienza, e quindi confidenza, di ogni gruppo oncologico-radioterapico nei confronti dei vari protocolli.

SISTEMA NASO-SINUSALE

Tra i fattori prognostici dei tumori maligni naso-sinusalmente sicuramente il più importante è il ritardo diagnostico (con conseguente ritardo terapeutico) quantificato in 4-12 mesi, dovuto alla aspecificità della sintomatologia di esordio che è propria anche di patologie flogistiche naso-sinusalmente croniche o ricorrenti, e alla difficoltà di ispezionare, senza ricorrere all'imaging, un sistema di cavità quanto mai articolato e complesso dal punto di vista anatomico^{67 116}. Tale ritardo porta di conseguenza ad un altro fattore prognostico negativo, un T clinico in fase avanzata, di grande volume e invasivo delle strutture adiacenti. Tutto ciò porta, il più delle volte, ad interventi demolitivi seguiti (o talora preceduti) da radioterapia^{22 85}. Sono stati eseguiti anche interessanti sperimentazioni di protocolli radio-chemioterapici neo-adiuvanti e adiuvanti^{22 85}.

IPOFARINGE

Uno dei problemi chiave, nel trattamento dei carcinomi dell'ipofaringe, è la necessità di far conciliare la radicalità oncologica con il desiderio di preservare la funzione fonatoria. Il fattore prognostico più importante è rappresentato dalla categoria

Tab. I.

Lembi, peduncolati o liberi rivascolarizzati, e visceri utilizzati per interventi di interposizione.

CAVO ORALE E OROFARINGE

INNESTO CUTANEO

LEMBI PEDUNCOLATI

L. di lingua
L. platisma
L. geni
L. sternocleidomastoidei
L. deltopettorale
L. miocutaneo gran pettorale
L. temporale

LEMBI LIBERI

L. antibrachiale (cinese)
L. laterale di coscia

RICOSTRUZIONE MANDIBOLARE

L. antibrachiale con radio
L. di perone
L. di cresta iliaca

IPOFARINGE

LEMBI PEDUNCOLATI

L. deltopettorale
L. di musc. gran pettorale
L. antibrachiale
L. laterale di coscia

LEMBI LIBERI

INTERPOSIZIONE DI VISCERI

Peduncolati

Pull up gastrico
Trasposizione colica
L. di digiuno

Liberi

di T e di N, che vengono a condizionare l'opzione terapeutica. Lo stadio I, con forme vegetanti superficiali (early cancer) e non infiltrative viene trattato oggi con RT esclusiva, con buoni risultati e con la preservazione della funzione fonatoria; i casi T1,T2 vegetante con N+ vengono sottoposti a RT esclusiva con eventuale chirurgia di recupero sull'N, oppure a chirurgia funzionale con svuotamento^{56 68 79 105}. Gli stadi III, IV indicano per lo più chirurgia demolitiva (faringo-laringectomia totale con o senza interposizione di viscere + RT post-operatoria)^{29 68 85 99 109}. Questa strategia comporta una perdita costante della funzione fonatoria, anche se esistono recenti interessanti tentativi di applicare, con qualche buon risultato, le valvole fonatorie al viscere interposto.

La recente ricerca ha tentato protocolli di preservazione d'organo, sperimentando, come trattamento di base, la radio-chemioterapia concomitante^{5 7 65 106 109} + eventuale chirurgia di «rattrapage». In uno studio retrospettivo su 73 casi in stadio III, IV è stato osservato che chirurgia + RT post-operatoria e radio-chemioterapia concomitanti con recupero chirurgico in caso di fallimento, hanno avuto sopravvivenze sovrapponibili, con il vantaggio che la radio-chemioterapia ha consentito la preservazione d'organo (e quindi della funzione fonatoria) in un elevato numero di pazienti senza compromettere la sopravvivenza.

LARINGE

I concetti espressi nella parte generale (riguardante tutti gli HNSCC) sull'importanza della categoria di T e di N nell'indicare una chirurgia conservativa (con i molti tipi di interventi, con o senza laser, ben sperimentati), una chirurgia demolitiva + RT post-operatoria, o una RT esclusiva, calzano a pennello per la sede laringea, e quindi ad essi rimandiamo senza stare a ripeterli ^{12 13 17 72 83 88 90 104 108 118 119}.

Quello che occorre qui ricordare è la necessità di una stadiazione pre-operatoria la più precisa possibile, in microlaringoscopia in narcosi con l'ausilio, che noi riteniamo fondamentale, di prelievi, più o meno numerosi, su tessuto presumibilmente sano, per evidenziare aree di displasia o di cancerizzazione sub-clinica.

Per gli stadi avanzati, ricordiamo gli studi di preservazione d'organo ²⁶ i quali usano la CT neo-adiuvante (protocollo di Al Sarraf) come trattamento selettivo per sottoporre il paziente a RT esclusiva: in caso di risposta completa o parziale (maggiore del 50%) dopo 2-3 cicli di CDDP + 5FU il paziente viene sottoposto a RT esclusiva (65-70 GY) + eventuale chirurgia di recupero in caso di fallimento; in caso di non risposta a 2-3 cicli di CDDP + 5FU il paziente viene sottoposto a laringectomia totale.

Gli studi fatti finora ci dicono che la sopravvivenza dei pazienti radio-chemio-trattati tende ad essere simile (ma non uguale) a quella dei pazienti trattati con chirurgia, con però il grande vantaggio di un elevato numero di preservazioni d'organo.

I problemi relativi a questi trattamenti sono a tutt'oggi ancora oggetto di discussione, a causa della grande complessità del trattamento e del suo eccessivo protrarsi nel tempo, delle notevoli difficoltà del follow-up (dovuti ai frequenti edemi post-attinici che possono mascherare la persistenza di malattia o la recidiva) e dei dati non univoci sulla sopravvivenza (in alcuni studi si parla di sopravvivenza globale e non NED). Desideriamo infine citare un recente lavoro di Laccourreye ⁷⁰, che ha osservato che una risposta completa o parziale alla CT neoadiuvante, in tumori in cui c'è indicazione alla laringectomia sopracricoidica, che faccia diventare mobile un'aritenoida fissa, è un fattore prognostico positivo.

Un discorso particolare va fatto per le displasie laringee, che vengono oggi per lo più classificate come LIN I-II-III, con evoluzione prognostica sfavorevole crescente, sulla base di ben codificate alterazioni del processo maturativi e della presenza di atipie cellulari: occorre segnalare che attualmente le ultime due classi, sulla base delle caratteristiche evolutive derivanti dall'esperienza clinica, vengono conglobate come LIN III ¹²⁵. Questa classificazione viene a condizionare decisamente la terapia: nelle forme LIN I risulta per lo più sufficiente l'exeresi completa della lesione seguita da follow-up stretto; le forme LIN II-III indicano invece un trattamento che varia dalla decorticazione cordale fino alla cordectomia (tradizionale o laser) a seconda dell'aggressività della lesione ^{9 43}.

GHIANDOLE SALIVARI

Lo stadio clinico del tumore è sicuramente un fattore prognostico importante, a proposito del quale è stato osservato un rapporto diretto tra evoluzione del T clini-

co e tendenza alla metastatizzazione e alla recidiva^{37 40 51}. Allo stadio clinico sono anche legati alla presenza di dolore (segno di infiltrazione nervosa), la paralisi del nervo facciale^{40 62 93 124}.

Con l'aggravarsi dello stadio clinico si passa dall'indicazione alla parotidectomia laterale superficiale con conservazione del VII n.c., senza svuotamento linfonodale cervicale, alla parotidectomia totale (talvolta estesa alle zone confinanti) con sacrificio del VII n.c. e svuotamento linfonodale cervicale.

Nel capitolo dedicato ai fattori prognostici clinici e patologici (cui rinviamo) abbiamo definito, in base all'istotipo, un gruppo di tumori a più bassa malignità da un gruppo di tumori a più alta malignità. Questa classificazione viene necessariamente a condizionare le indicazioni chirurgiche conservative senza svuotamento cervicale e quella demolitiva. La stessa classificazione, specie se in concomitanza con altri fattori prognostici negativi derivanti dal pTNM, potrà indicare o meno una RT post-operatoria.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Al Sarraf M., Le Blanc M., Giri PG, Fu KK, Cooper J, Vuong T, et al. *Chemotherapy versus radiotherapy in patients with advanced nasopharyngeal cancer. Phase III Randomized Intergroup Study 0099*. J Clin Oncol 1998;16:1310-7.
- ² Al-Sarraf M, Le Blanc M. *Improved five years survival with chemo-radiotherapy (CT – RT) vs radiotherapy (RT) in patients with advanced nasopharyngeal cancer. Phase III study: progress report*. Ann Oncol 2000;11:90-8.
- ³ Alsner J, Sorensen SB, Overgaard J. *TP53 mutation is related to poor prognosis after radiotherapy, but not surgery, in squamous cell carcinoma of the head and neck*. Radiother Oncol 2001;59:179-85.
- ⁴ Altun M, Fandi A, Dupuis O, Cvitkovic E, Krajina Z, Eschwege F. *Undifferentiated nasopharyngeal cancer (UCNT): current diagnostic and therapeutic aspects*. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995;32:859-77.
- ⁵ Amdur RJ, Mendenhall WM, Stringer SP, Villaret DB, Cassisi NJ. *Organ preservation with radiotherapy for T1-T2 carcinoma of the pyriform sinus*. Head Neck 2001;23:353-62.
- ⁶ Ash CS, Nason RW, Abdoh AA, Cohen MA. *Prognostic implications of mandibular invasion in oral cancer*. Head Neck 2000;22:794-8.
- ⁷ Beauvillain C, Mahè M, Bourdin S, Peuvrel P, Bergerot P, Riviere A, et al. *Final results of a randomized trial comparing chemotherapy plus radiotherapy with chemotherapy plus surgery plus radiotherapy in locally advanced resectable hypopharyngeal carcinoma*. Laryngoscope 1997;107:648-53.
- ⁸ Björk-Eriksson T, West C, Cvetskovska E, Svensson M, Karlsson E, Magnusson B, et al. *The lack of correlation between proliferation (Ki-67, PCNA, LI, Tpot), p53 expression and radiosensitivity for head and neck cancer*. Br J Cancer 1999;80:1440-4.
- ⁹ Blackwell KE, Calcaterra TC, Fu IY, et al. *Laryngeal dysplasia: epidemiology and treatment outcome*. Ann Otol Rhinol Laryngol 1995;104:596-602.
- ¹⁰ Blitzer PH, Wang CC, Suit HD. *Blood pressure and hemoglobin concentration: multivariate analysis of local control after irradiation for head and neck cancer*. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1994;10(Suppl 2):98-102.
- ¹¹ Bocca E, Pignataro O, Oldini C, Cappa C. *Functional neck dissection. An evaluation and review of 843 cases*. Laryngoscope 1984; 94:942-5.
- ¹² 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*. Am J Epidemiol 1997;145:1100-5.
- ¹³ Bradford CR, Wolf GT, Fisher SG, McClatchey KD. *Prognostic importance of surgical margins in advanced laryngeal squamous carcinoma*. Head Neck 1996;18:11-6.

- ¹⁴ Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, et al. *Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck.* N Engl J Med 1995;332:712-7.
- ¹⁵ Brizel DM, Albers ME, Fisher SR, Scher RL, Richtsmeier WJ, Hars V, et al. *Hyperfractionated irradiation with or without concurrent chemotherapy for locally advanced head and neck cancer (HNC).* N Engl J Med 1998;338:1798-804.
- ¹⁶ Brockstein B, Kies M. *Concomitant chemoradiotherapy (CRT) with Paclitaxel (T), 5-fluorouracil (F), Hydroxyurea (H) and twice daily (BID) radiotherapy (RT) for locoregional advanced head neck cancer (HNC).* Proc Am Soc Clin Oncol 1999;18:391-5.
- ¹⁷ Bron LP, Soldati D, Zouhair A, Ozsahin M, Brossard E, Monnier P, et al. *Treatment of early stage squamous-cell carcinoma of the glottic larynx: endoscopic surgery or cricohyoidoepiglottopexy versus radiotherapy.* Head Neck 2001;23:823-9.
- ¹⁸ Browman GP, Hodson DI, Mackenzie RJ, Bestic N, Zuraw L. *Choosing a concomitant chemotherapy and radiotherapy regimen for squamous cell head and neck cancer. A sistematic review of the published literature with subgroup analysis.* Head Neck 2001;23:579-89.
- ¹⁹ Brown JM. *Tumor radiosensitivity: it's the subpopulations that count.* Int J Radiat Oncol Biol Phys 2000;47:549-50.
- ²⁰ Brown JS, Lowe D, Kalavrezos N, D'Souza J, Magennis P, Woolgar J. *Patterns of invasion and routes of tumor entry into the mandible by oral squamous cell carcinoma.* Head Neck 2002;24:370-83.
- ²¹ Calais G, Alfonsi M. *Randomized study comparing radiation alone (RT) versus RT with concomitant chemotherapy (CT) in stages III and IV oropharynx carcinoma (ARCORO). Preliminary results of the 94.01 study from the French group of Radiation Oncology for Head and Neck Cancer (GORTEC).* Proc Am Soc Clin Oncol 1998;17:385-90.
- ²² Carrau RL, Myers EN. *Paranasal sinus carcinoma: diagnosis, treatment and prognosis.* Oncology 1992;6:43-50.
- ²³ Chan ATC, Teo PML, Leung TW, Johnson PJ. *The Role of chemotherapy in the management of nasopharyngeal carcinoma.* Cancer 1998;82:1003-12.
- ²⁴ Chua DT, Sham JS, Wei WI, Ho WK, Au G, Choy D. *Control of regional metastasis after induction chemotherapy and radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma.* Head Neck 2002;24:350-60.
- ²⁵ Chua DTT, Sham JST, Choy D, Lorvidhaya V, Sumitsawan Y, Thongprasert S, et al. *Preliminary report of the Asian-Oceanian Clinical Oncology Association: randomized trial comparing cisplatin and epirubicin followed by radiotherapy versus radiotherapy alone in the treatment of patients with locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma.* Cancer 1998;83:2270-83.
- ²⁶ Cortesina G, De Stefani A, Cavalot A, Albera R, Rosso P, Bussi M. *Current role of radiotherapy in the treatment of locally advanced laryngeal carcinomas.* J Surg Oncol 2000;74:79-82.
- ²⁷ Cortesina G, Martone T, Galeazzi E, Olivero M, De Stefani A, Bussi M, et al. *Staging of head and neck squamous cell carcinoma using the MET oncogene product as marker of tumor cells in lymph node metastases.* Int J Cancer 2000;89:286-92.
- ²⁸ Dassonville O, Formento JL, Francoual M, Ramaioli A, Santini J, Schneider M, et al. *Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer.* J Clin Oncol 1993;11:1873-8.
- ²⁹ De Meester W, Cancemi G. *Neoplasie dell'ipofaringe.* In: *Fattori prognostici in oncologia cervico-cefalica.* Quaderni monografici di aggiornamento A.O.O.I. 1998.
- ³⁰ De Stefani A, Forni G, Ragona R, Cavallo G, Bussi M, Usai A, et al. *Improved survival with perilymphatic interleukin 2 in patients with resectable squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx.* Cancer 2002;95:90-7.
- ³¹ De Visscher JG, Botke G, Schakenraad JA, van der Waal I. *A comparison of results after radiotherapy and surgery for stage I squamous cell carcinoma of the lower lip.* Head Neck 1999;21:526-30.
- ³² Di Renzo MF, Olivero M, Martone T, Maffe A, Maggiora P, Stefani AD, et al. *Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas.* Oncogene 2000;19:1547-55.
- ³³ Dole M, Nunez G, Merchant AK, Maybaum J, Rode CK, Bloch CA, et al. *Bcl-2 inhibits chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma.* Cancer Res 1994;54:3253-9.

- 34 Dong Y, Sui Li, Sugimoto K, Sugimoto K, Tai Y, Tokuda M. *Cyclin D1-CDK4 complex, a possible critical factor for cell proliferation and prognosis in laryngeal squamous cell carcinomas*. Int J Cancer 2001;95:209-15.
- 35 Easson EC, Russell MH. *The curability of cancer in various sites*. Baltimore: Williams and Wilkins 1978.
- 36 El-Sayed S, Nelson N. *Adjuvant and adjunctive chemotherapy in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck region. A meta-analysis of prospective and randomized trials*. J Clin Oncol 1996;14:838-47.
- 37 Ethunandan M, Pratt CA, Macpherson DW. *Changing frequency of parotid gland neoplasms: analysis of tumours treated in a district general hospital*. Ann R Coll Surg Engl 2002;84:1-6.
- 38 Feher O, Martins SJ, Lima CA, Salvajoli JV, Simpson AJ, Kowalski LP. *Pilot trial of concomitant chemotherapy with paclitaxel and split-course radiotherapy for very advanced squamous cell carcinoma of head and neck*. Head Neck 2002;24:228-35.
- 39 Fein D, Mendenhall WM, Parsons JT, McCarty PJ, Stringer SP, Million RR, et al. *Carcinoma of oral tongue: a comparison of results and complication of treatment with radiotherapy and/or surgery*. Head Neck 1994;16:358-65.
- 40 Frankenthaler RA, Luna MA, Lee SS, Ang KK, Byers RM, Guillaumondegui OM, et al. *Prognostic variables in parotid gland cancer*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1991;117:1251-6.
- 41 Fu KK, Hammon E, Pajak TF. *Flow cytometric quantification of the proliferation associated nuclear antigen p105 DNA content in advanced head and neck cancer: results of RTOG 91-08*. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1994;29:661-71.
- 42 Fujiwara T, Grimm EA, Mukhopadhyay T, Zhang WW, Owen-Schaub LB, Roth JA. *Induction of chemosensitivity in human lung cancer cells in vivo by adenovirus-mediated transfer of the wild-type p53 gene*. Cancer Res 1994;54:2287-91.
- 43 Gallo A, De Vincentis M, Della Rocca C, Moi R, Simonelli M, Minni A, et al. *Evolution of precancerous laryngeal lesions: a clinicopathologic study with long-term follow-up on 259 patients*. Head Neck 2001;23:42-7.
- 44 Gallo O, Chiarelli I, Boddi V, Bocciolini C, Bruschini L, Porfirio B. *Cumulative prognostic value of p53 mutations and bcl-2 protein expression in head-and-neck cancer treated by radiotherapy*. Int J Cancer 1999;84:573-9.
- 45 Ganly I, Soutar DS, Brown R, Kaye SB. *p53 alterations in recurrent squamous cell cancer of the head and neck refractory to radiotherapy*. Br J Cancer 2000;82:392-8.
- 46 Geara FB, Glisson BS, Sanguineti G, Tucker SL, Garden AS, Ang KK, et al. *Induction chemotherapy followed by radiotherapy versus radiotherapy alone in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma. Results of a matched cohort study*. Cancer 1997;79:1279-86.
- 47 Giatromanolaki A, Koukourakis M, Georgoulasi V, Gatter KC, Harris AL, Fountzilias G. *Angiogenesis vs response after combined chemoradiotherapy of squamous cell head and neck carcinoma*. Int J Cancer 1999;80:810-7.
- 48 Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Fountzilias G. *c-erbB-2 oncoprotein is overexpressed in poorly vascularised squamous cell carcinomas of the head and neck, but is not associated with response to cytotoxic therapy or survival*. Anticancer Res 2000;20:997-1004.
- 49 Goldsmith MM, Cresson DS, Arnold LA, Postma DS, Askin FB, Pillsbury HC. *DNA flow cytometry as a prognostic indicator in head and neck cancer*. Otolaryngol Head Neck Surg 1987;96:307-18.
- 50 Goldsmith MM, Cresson DS, Postma DS, Askin FB, Pillsbury HC. *Significance of ploidy in laryngeal cancer*. Am J Surg 1986;152:396-402.
- 51 Gonzales Lagunas J, Rodado C, Raspall G, Bermejo B, Huguet P, Giralt J. *Malignant tumors of the minor salivary glands: Retrospective study on 59 cases*. Med Oral 2001;6:142-7.
- 52 Gorski DH, Beckett MA, Jaskowiak NT, Calvin DP, Mauceri HJ, Salloum RM, et al. *Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation*. Cancer Res 1999;59:3374-8.
- 53 Hall SF, Groome PA, Rothwell D, Dixon PF. *Using the TNM system to predict survival in squamous cell carcinoma of the head and neck*. Anticancer Res 1998;18:4777-8.
- 54 Hichs W. *Surgery as a single modality therapy for squamous cell carcinoma of the oral tongue*. Am J Otolaryng 1998;19:24-8.

- 55 Hinerman RW., Parsons JT, Mendenhall WM, Stringer SP, Cassisi NJ, Million RR. *External beam irradiation alone or combined with neck dissection for base of tongue carcinoma: an alternative to primary surgery.* Laryngoscope 1994;104:1466-70.
- 56 Ho CM, Ng WF, Lam KH, Wei WJ, Yuen AP, et al. *Submucosal tumor extension in hypopharyngeal cancer.* Otolaryngol Head Neck Surg 1997;123:959-65.
- 57 Horwitz EM, Frazier AJ, Vicini FA, Clarke DH, Edmundson GK, Keidan RD, et al. *The impact of temporary iodine-125 interstitial implant boost in the primary management of squamous cell carcinoma of the oropharynx.* Head Neck 1997;12:219-26.
- 58 Huang Dt, Johnson CR, Schmidt-Ullrich R, Grimes M. *Postoperative radiotherapy in head and neck carcinoma with extracapsular lymph node extension and/or positive resection margins.* Int J Radiat Oncol Biol Phys 1992;23:737-42.
- 59 International Nasopharynx Cancer Study Group VUNCA I Trial. *Preliminary results of a randomized trial comparing neoadjuvant chemotherapy (cisplatin, epirubicin, bleomycin) plus radiotherapy versus radiotherapy alone in stage IV (N2M0) undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: a positive effects on progression free survival.* Int J Radiat Oncol Biol Phys 1996;35:463-70.
- 60 Ionna F, Chiesa F, Longo F, Manola M, Villano S, Calabrese L, et al. *Prognostic value of sentinel node in oral cancer.* Tumori 2002;88:S18-9.
- 61 Jones KR, Lodge-Rigal D, Reddick RL, Tudor GE, Shockley WW. *Prognostic factors in the recurrence of stage I and II squamous cell cancer of the oral cavity.* Arch Otolaring Head Neck Surg 1992;118:483-5.
- 62 Kane W, Mc Caffrey TV, Olsen KD, Lewis JE. *Primary parotid malignancies: a clinical and pathological review.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1991;117:301-15.
- 63 Khafif RA, Gelbfish GA, Tepper P, Attie JN. *Elective radical neck dissection in epidermoid cancer of the head and neck.* Cancer 1991;67:67-71.
- 64 Kies MS, Haraf DJ, Athanasiadis I, Kozloff M, Mittal B, Pelzer H, et al. *Induction chemotherapy followed by concurrent chemoradiation for advanced head and neck cancer: improved disease control and survival.* J Clin Oncol 1998;16:2715-21.
- 65 Kim S, Wu HG, Heo DS, Kim KH, Sung MW, Park CI. *Advanced hypopharyngeal carcinoma treatment results according to treatment modalities.* Head Neck 2001;23:713-7.
- 66 Koch WM, Brennan JA, Zahurak M, Goodman SN, Westra WH, Schwab D, et al. *p53 mutation and locoregional treatment failure in head and neck squamous cell carcinoma.* J Natl Cancer Inst. 1996;88:1580-6.
- 67 Kondo M, Ogawa K, Inuyama Y, Yamashita S, Tominaga S, Shigematsu N, et al. *Prognostic factors influencing relapse of squamous cell carcinoma of the maxillary sinus.* Cancer 1985;55:190-6.
- 68 Kraus DH, Bock H, Brock HA, Huo J, Harrison LB, Shah JP. *Combined surgery and radiation therapy for squamous cell carcinoma of the hypopharynx.* Otolaryngol Head Neck Surg 1997;116:637-41.
- 69 Kubler AC, De Carpentier J, Hopper C, Leonard AG, Putnam G. *Treatment of squamous cell carcinoma of the lip using Foscan-mediated photodynamic therapy.* Int J Oral Maxillofac Surg 2001;30:504-9.
- 70 Laccourreye O, Brasnu D, Biacabe B, Hans S, Seckin S, Weinstein G. *Neo-adjuvant chemotherapy and supracricoid partial laryngectomy with cricohyoidopexy for advanced endolaryngeal carcinoma classified as T3-T4: 5 year oncologic results.* Head Neck 1998;20:595-9.
- 71 Langdon JD., Harwey PW, Rapidis AD, Patel MF, Johnson NW, Hopps R. *Oral cancer: the behaviour and response to treatment of 194 cases.* J Maxillofac Surg 1977;5:221-37.
- 72 Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, van der Waal I, Snow GB. *Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymphnode metastases as a prognostic factor.* Cancer 1994;73:187-90.
- 73 Leung TW, Wong VY, Kwan KH, Ng TY, Wong CM, Tung SY, et al. *High dose rate brachytherapy for early stage oral tongue cancer.* Head Neck 2002;24:274-81.
- 74 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.
- 75 Maltz R, Shumrick D, Aron B, Weichert K. *Carcinoma of the tonsil: results of combined therapy.*

- Laryngoscope 1974;78:2172-80.
- 76 Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M, Erozan YS, Merlo A, Schwab D, et al. *Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis*. Science 1996;271:659-62.
- 77 Mauceri HJ, Hanna NN, Beckett MA, Gorski DH, Staba MJ, Stellato KA, et al. *Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumour therapy*. Nature 1998;394:287-91.
- 78 Maurizi M, Almadori G, Ferrandina G, Distefano M, Romanini ME, Cadoni G, et al. *Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma*. Br J Cancer 1996;74:1253-7.
- 79 Mendenhall WM, Parson JT, Devine JW, Cassisi NJ, Million RR. *Squamous cell carcinoma of pyriform sinus treated with surgery and/or radiotherapy*. Head Neck Surg 1987;10:88-92.
- 80 Merlano M, Benasso M, Corvo R, Rosso R, Vitale V, Blengio F, et al. *Five-years update of a randomized trial of alternating radiotherapy and chemotherapy compared with radiotherapy alone in treatment of unresectable squamous cell carcinoma of the head and neck*. J Natl Cancer Inst 1996;88:583-9.
- 81 Michalides RJAM, van Veelen NMJ, Kristel PMP, Hart AA, Loftus BM, Hilgers FJ, et al. *Overexpression of cyclin D1 indicates a poor prognosis in squamous cell carcinoma of head and neck*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1997;123:497-502.
- 82 Milas L, Kishi K, Hunter N, Mason K, Masferrer JL, Tofilon PJ. *Enhancement of tumor response to gamma-radiation by an inhibitor of cyclooxygenase-2 enzyme*. J Natl Cancer Inst 1999;91:1501-4.
- 83 Million RR, Cassisi NJ. *Management of head and neck cancer: a multidisciplinary approach*. 2nd Ed. Philadelphia: Lippincot Company 1994.
- 84 Molinari R. *Basi scientifiche per la definizione di linee guida in ambito clinico per i tumori epiteliali della testa e del collo*. Progetto finalizzato ACRO del CNR 1999.
- 85 Molinari R, Cortesina G, Olmi P. *I tumori epiteliali della testa e del collo. Basi scientifiche per la definizione di linee guida in ambito clinico per i tumori*. Consiglio Nazionale delle Ricerche 1999.
- 86 Montana G, Hellman S, Von Essen C, Kligerman M. *Carcinoma of the tongue and floor of the mouth: results of radical radiotherapy*. Cancer 1069;23:1284-9.
- 87 Moose BD, Kelly MD, Levine PA, Constable WC, Cantrell RW, Lerner JM. *Definitive radiotherapy for T1 and T2 squamous cell carcinoma of the tonsil*. Head Neck 1995;17:334-8.
- 88 Mukherji SK, O' Brien SM, Gerstle RJ, Weissler M, Shockley W, Stone JA, et al. *The ability of tumor volume to predict local control in surgically treated squamous cell carcinoma of the supraglottic larynx*. Head Neck 2000;22:282-7.
- 89 Muller D, Millon R, Lidererau R, Engelmann A, Bronner G, Flesch H, et al. *Frequent amplification of 11q13 DNA markers is associated with lymph node involvement in human head and neck squamous cell carcinomas*. Oral Oncol Eur J Cancer 1994;30:113-20.
- 90 Myers EN, Suen JY. *Cancer of the head and neck*. Philadelphia: Ed. WB Saunders Company 1996.
- 91 Nathan CA, Carter P, Liu L, Li BD, Abreo F, Tudor A, et al. *Elevated expression of eIF4E and FGF-2 isoforms during vascularization of breast carcinomas*. Oncogene 1997;15:1087-94.
- 92 Nathan CA, Franklin S, Abreo FW, Nassar R, De Benedetti A, Glass J. *Analysis of surgical margins with the molecular marker eIF4E: a prognostic factor in patients with head and neck cancer*. J Clin Oncol 1999;17:2909-14.
- 93 O' Brien CJ, Soong SJ, Herrera GA, Urist MM, Maddox WA. *Malignant salivary tumors: analysis of prognostic factors and survival*. Head Neck 1986;9:82-92.
- 94 Panizzut B, Carlevato MT, Ferro S, Cavalot AL, Gervasio CF, Ricci E, et al. *Adhesion molecules in squamous cell carcinoma of the larynx: possible indication of prognosis*. Acta Otorhinolaryngol Ital 1997;17:347-56. Italian.
- 95 Pastore A, Turetta GD, Tarabini A, Turetta D, Feggi L, Pelucchi S. *Sentinel lymph node analysis in squamous carcinoma of the oral cavity and oropharynx*. Tumori 2002;88:S58-60.
- 96 Pernot M, Hoffstetter S, Peiffert D, Luporsi E, Marchal C, Kozminski P, et al. *Epidermoid carcinoma of the floor of the mouth treated with exclusive irradiation: statistical study of a series of 201 cases*. RadioTherapy Oncol 1995;35:177-85.
- 97 Pignataro L, Pruneri G, Carboni N, Capaccio P, Cesana BM, Neri A, et al. *Clinical relevance of cyclin D1 overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma*. J Clin Oncol 1998;9:3069-77.
- 98 Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designe L. *Chemotherapy added to locoregional treatment for*

- head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. *Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer*. Lancet 2000;355:949-55.
- ⁹⁹ Pingree TF, Davis RK, Reichman O, Derrick L. *Treatment of Hypopharyngeal carcinoma: a 10 year review of 1362 cases*. Laryngoscope 1987;97:901-4.
- ¹⁰⁰ Pradhan SA. *Surgery for cancer of the buccal mucosa*. Sem Surg Oncol 1989;5:318-21.
- ¹⁰¹ Rabuzzi DD, Mickler AS, Clutter DJ, Chung CT, Sagerman RH. *Treatment results of combined high dose preoperative radiotherapy and surgery for oropharyngeal cancer*. Laryngoscope 1982;92:989-91.
- ¹⁰² Ramirez Amador V, Esquivel-Pedraza L, Ochoa-Carrillo FJ, Cuapio-Ortiz A, Frias-Mendivil M, Meneses-Garcia A, et al. *Cancer of the mobile tongue in Mexico. A retrospective study of 170 patients*. Eur J Cancer B Oral Oncol 1995;31:37-40.
- ¹⁰³ Ravi D, Ramadas K, Mathew BS, Panikkar KR, Nair MK, Pillai MR. *Apoptosis, angiogenesis and proliferation: trifunctional measure of tumour response to radiotherapy for oral cancer*. Oral Oncol 2001;37:164-71.
- ¹⁰⁴ Resnick MJ, Uhlman D, Niehans GA, Gapany M, Adams G, Knapp D, et al. *Cervical lymph node and survival in laryngeal carcinoma: prognostic factors*. Ann Otol Rhinol Laryngol 1995;104:685-94.
- ¹⁰⁵ Ries LAG, Miller BA, eds. SEER Cancer Statistic Review, 1973-1991. Tables and Graphs, National Cancer Institute. NHI Pub. No. 94-2789, Bethesda, MD: NIH, 1994.
- ¹⁰⁶ Robbins KT, Kumar P, Wong FS, Hartsell WF, Flick P, Palmer R, et al. *Targeted chemoradiation for advanced head and neck cancer: analysis of 213 patients*. Head Neck 2000;22:687-93.
- ¹⁰⁷ Rossi A, Molinari R, Boracchi P, Del Vecchio M, Marubini E, Nava M, et al. *Adjuvant chemotherapy with vincristine, cyclophosphamide and doxorubicin after radiotherapy in local-regional nasopharyngeal cancer: results of a 4-year multicentric randomized study*. J Clin Oncol 1998;6:1401-10.
- ¹⁰⁸ Sakata K, Aoki Y, Karasawa K, Hasezawa K, Muta N, Nakagawa K, et al. *Radiation Therapy in early glottic carcinoma: uni- and multivariate analysis of prognostic factors affecting local control*. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1994;30:1059-64.
- ¹⁰⁹ Samant S, Kumar P et al. *Concomitant radiation therapy and targeted cisplatin chemotherapy for the treatment of advanced pyriform sinus carcinoma: disease control and preservation of organ function*. Head Neck 1999;21:595-601.
- ¹¹⁰ Samant S, Robbins KT, Kumar P, Ma JZ, Vieira F, Hanchett C. *Bone or cartilage invasion by advanced head and neck cancer: intra-arterial supradose cisplatin chemotherapy and concomitant radiotherapy for organ preservation*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2001;127:1451-6.
- ¹¹¹ Santoro A. *Terapia medica oncologica*. III Ed. 2001. Edises.
- ¹¹² Sardi I, Franchi A, Ferriero G, Frittelli A, Bruschini L, Montali E, et al. *Prediction of recurrence by microsatellite analysis in head and neck cancer*. Genes Chromosomes Cancer 2000;29:201-6.
- ¹¹³ Schuller D, King G, Smith R, Wilson H, James A, Batley F. *Combination therapy protocol for stage III or IV carcinoma of the oral cavity, oropharynx and hypopharynx*. Laryngoscope 1980;90:1263-72.
- ¹¹⁴ Schwartz GJ, Mehta RH, Wenig BL, Shaligram C, Portugal LG. *Salvage treatment for recurrent squamous cell carcinoma of the oral cavity*. Head Neck 2000;22:34-41.
- ¹¹⁵ Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. *bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes*. Cell 1991;67:879-88.
- ¹¹⁶ Sisson GA, Toriumi DM, Atiyah RA. *Paranasal sinus malignancy: a comprehensive update*. Laryngoscope 1989;99:143-50.
- ¹¹⁷ Slaughter DP, Soutwick HW, Smejkal W. *Field cancerization in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin*. Cancer 1953;5:963-70.
- ¹¹⁸ Spector JG, Session DG, Chao KS, Hanson JM, Simpson JR, Perez CA. *Management of stage II (T2N0M0) glottic carcinoma by radiotherapy and conservation surgery*. Head Neck 1999;21:116-23.
- ¹¹⁹ Spector JG, Session DG, Chao KS, Haughey BH, Hanson JM, Simpson JR, et al. *Stage I (T1N0M0) squamous cell carcinoma of the laryngeal glottis : therapeutic results and voice preservation*. Head Neck 1999;21:707-17.

- ¹²⁰ Steiner G, Schoenberg MP, Linn JF, Mao L, Sidransky D. *Detection of bladder cancer recurrence by microsatellite analysis of urine*. *Nat Med* 1997;3:621-4.
- ¹²¹ Stell PM. *Ploidy in head and neck cancer: a review and meta-analysis*. *Clin Otolaryngol* 1991;16:510-6.
- ¹²² Strasser A, Harris AW, Cory S. *bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship*. *Cell* 1991;67:889-99.
- ¹²³ Vandembrouck C. *Elective neck vs therapeutic radical neck dissection in epidermoid carcinoma of the oral cavity. Results of a randomized clinical trial*. *Cancer* 1980;46:386-94.
- ¹²⁴ Vander Poorten VLM, Balm AJM, Hilgers FJ, Tan IB, Keus RB, Hart AA, et al. *Stage as major long term outcome predictor in minor salivary gland carcinoma*. *Cancer* 2000;89:1595-204.
- ¹²⁵ Vodovnik A, Gala N, Kambic V, Luzar B. *Correlation of histomorphological criteria used in different classification of epithelial hyperplastic lesions of the larynx*. *Acta Otolaryngol* 1997;527(Suppl):16-9.
- ¹²⁶ Vokes E. *Induction chemotherapy (IndCT) followed by concomitant chemoradiotherapy (CXRT) for stage IV head and neck cancer (HNC): an attempt at locoregional and systemic tumor control*. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000;19:419-25.
- ¹²⁷ Wang Y, Hung SC, Linn JF, Steiner G, Glazer AN, Sidransky D, et al. *Microsatellite-based cancer detection using capillary array electrophoresis and energy-transfer fluorescent primers*. *Electrophoresis* 1997;18:1742-9.
- ¹²⁸ Weidner N. *Intratumor microvessels density as a prognostic factor in cancer*. *Am J Pathol* 1995;147:9-19.
- ¹²⁹ Wen QH, Miwa T, Yoshizaki T, Nagayama I, Furukawa M, Nishijima H. *Prognostic value of EGFR and TGF-alpha in early laryngeal cancer treated with radiotherapy*. *Laryngoscope* 1996;106:884-8.
- ¹³⁰ Wendt TG, Grabenbauer GG, Rodel CM, Thiel HJ, Aydin H, Rohloff R, et al. *Simultaneous radiochemotherapy versus radiotherapy alone in advanced head and neck cancer: a randomized study*. *J Clin Oncol* 1998;16:1318-24.
- ¹³¹ Werning JW, Byers RM, Novas MA, Roberts D. *Preoperative assessment for and outcomes of mandibular conservation surgery*. *Head Neck* 2001;23:1024-30.
- ¹³² Wolfensberger M, Zbaeren P, Dulguerov P, Muller W, Arnoux A, Schmid S. *Surgical treatment of early oral carcinoma-results of a prospective controlled multicenter study*. *Head Neck* 2001;23:525-30.
- ¹³³ Wong JR. *Is chemotherapy beneficial in the treatment of locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma?* *Cancer* 1998;83:2255-8.
- ¹³⁴ Zatterstrom UK, Brun E, Willen R, Kjellen E, Wennerberg J. *Tumor angiogenesis and prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Head Neck* 1995;17:312-8.

XII. LO STATO ATTUALE DELLA RICERCA SULLA TERAPIA GENICA NEI TUMORI DEL DISTRETTO CERVICO-FACCIALE

T. Martone, R. Albera, F. Palonta, G. Cortesina

Gli studi di biologia molecolare, mirati alla comprensione della struttura e della funzione di geni e proteine coinvolti nei meccanismi della cancerogenesi e della progressione neoplastica, hanno modificato l'approccio verso la cura delle patologie neoplastiche, aprendo la strada a strategie terapeutiche innovative che, pur non potendo al momento attuale sostituirsi alle terapie neoplastiche tradizionali, potrebbero presto diventare uno strumento efficace nella terapia adiuvante.

Nel campo della terapia dei tumori del distretto cervico-facciale, nonostante i notevoli progressi ottenuti negli ultimi 20 anni, con l'impiego di protocolli terapeutici integrati di chemio- e radio-terapia associati al trattamento chirurgico, abbiano migliorato, seppur non di molto, l'aspettativa di vita dei soggetti affetti da questa patologia, tali neoplasie sono caratterizzate ancora da un'elevata letalità. Il fallimento della chemio- e radio-terapia è attribuibile in gran parte all'instabilità genetica delle cellule neoplastiche, alla loro eterogeneità e all'elevato indice mutazionale delle stesse. Di qui la necessità di ricercare nuove strategie terapeutiche, per così dire razionali, che tengano conto dei notevoli progressi fatti dalla ricerca di base nella comprensione dei meccanismi molecolari e patogenetici coinvolti nella crescita tumorale e nella progressione neoplastica.

Nei capitoli precedenti abbiamo ampiamente descritto i meccanismi molecolari alla base dei processi di cancerogenesi, quali l'attivazione di oncogeni, la perdita di geni oncosoppressori, l'elusione della risposta immunitaria e l'induzione di neovascolarizzazione. In particolare, abbiamo trattato quelli più specificamente coinvolti nella progressione neoplastica dei carcinomi cervico-facciali, riassunti nella Tabella I. In questo capitolo cercheremo di descrivere quali sono, ad oggi, le diverse strategie di terapia genica dirette contro le origini molecolari del tumore, volte a contrastare tali meccanismi.

PRINCIPI DI TERAPIA GENICA

Per terapia genica s'intende il «trasferimento di un gene terapeutico all'interno di una cellula bersaglio» al fine di ripristinarne la normale funzione genica ²¹. Il gene trasferito può «rimpiazzare» la perdita di funzione di un gene difettivo onco-soppressore o, al contrario, «inibire selettivamente» la funzione di un oncogene espres-

Tab. I.

Fattori molecolari potenziali markers di prognosi dei carcinomi HNSCC.

-
- Instabilità cromosomica e microsatteliti
 - Recettori per fattori di crescita
EGFR
ErbB-2
 - Proteine regolatorie del ciclo cellulare
P16, p21, p27, ciclina D1
 - Gene oncosoppressore p53
 - Telomerasi
 - Proteine regolatorie dell'apoptosi
Bcl2/Bax
 - Fattori angiogenetici
VEGF, bFGF MMP2, MMP9
 - Molecole di adesione
Integrine, laminine, caderine
-

(Fonte: Hussein MR, Cullen K. *Molecular biomarkers in HNSCC, prognostic and therapeutic implications*. Expert Rev Anticancer Ther 2001)

so in forma aberrante. In aggiunta a tali meccanismi d'azione, il gene può essere introdotto nelle cellule al fine di codificare prodotti proteici che vadano ad incrementare l'immunogenicità del tumore o che inducano la morte della cellula tumorale stessa. Il trasferimento del materiale genetico può avvenire direttamente nelle cellule o nei tessuti di un paziente (terapia genica in vivo), oppure le cellule possono essere prelevate per inserirvi, in vitro, il materiale genetico, prima di reintrodurle nel paziente (terapia genica ex vivo). Quest'ultima strategia, indiretta, anche se più lunga offre il vantaggio di una migliore efficienza di trasferimento e la possibilità di selezionare e amplificare le cellule modificate prima della loro reintroduzione. Un aspetto essenziale della terapia genica, che ancora oggi rappresenta il limite maggiore al suo utilizzo, è che i geni da trasferire siano introdotti efficientemente nelle cellule del paziente e che mantengono alti livelli di espressione a livelli adeguati per lungo tempo. A tale scopo sono in corso di studio differenti vettori genetici, intesi come «particelle» in grado di veicolare il materiale genetico nelle cellule; ve ne sono molteplici, essenzialmente suddivisi in due categorie: virali (retrovirus, lentivirus, adenovirus, herpes simplex virus) e non virali, di tipo chimico (lipidi cationici complessati con DNA plasmidico, complessi proteina-DNA) o fisico (elettroporazione o microiniezioni plasmidiche) che, nell'insieme, presentano vantaggi e limitazioni al loro utilizzo, e nessuno rappresenta, ad oggi, il sistema ideale per il trasferimento di geni in un ospite umano^{1 74}.

PRINCIPALI STRATEGIE DI TERAPIA GENICA

Il termine terapia genica è molto ampio e comprende strategie differenti.

Le strategie emergenti sono rivolte principalmente:

1) al ripristino della funzione difettiva di un gene onco-soppressore (terapia genica sostitutiva);

2) all'aumento dell'immunogenicità del tumore, mediante geni che codificano antigeni propri del tumore o estranei (alloantigeni), e/o al rafforzamento della risposta immunitaria, normalmente soppressa nei tumori, mediante inserzione di geni codificanti citochine (IL-2, TNF, GM-CSF) (immunoterapia);

3) al trasferimento di geni che codificano composti tossici (geni suicidi), o che codificano molecole «pro-farmaco», che conferiscono sensibilità ad un farmaco ad effetto chemioterapeutico, che somministrato successivamente sia in grado di uccidere le cellule recettive (terapia genica «suicida»);

4) all'inibizione mirata dell'espressione aberrante di un oncogene mediante RNA-antisense o ribozimi (terapia antisense).

Circa la metà dei protocolli di terapia genica attualmente in corso sono basati sul principio dell'immunoterapia⁴⁷. In particolare, i trials di immunoterapia in corso riguardano soprattutto la cura del melanoma. Il 23%, sono trials di terapia genica sostitutiva mirati al ripristino della funzione genica del gene onco-soppressore p53. I restanti si basano sul principio della terapia genica suicida ed usano il gene codificante la timidino-chinasi dell'herpes simplex virus (HSV-tk) come attivatore del profarmaco ganciclovir (Fig. 1).

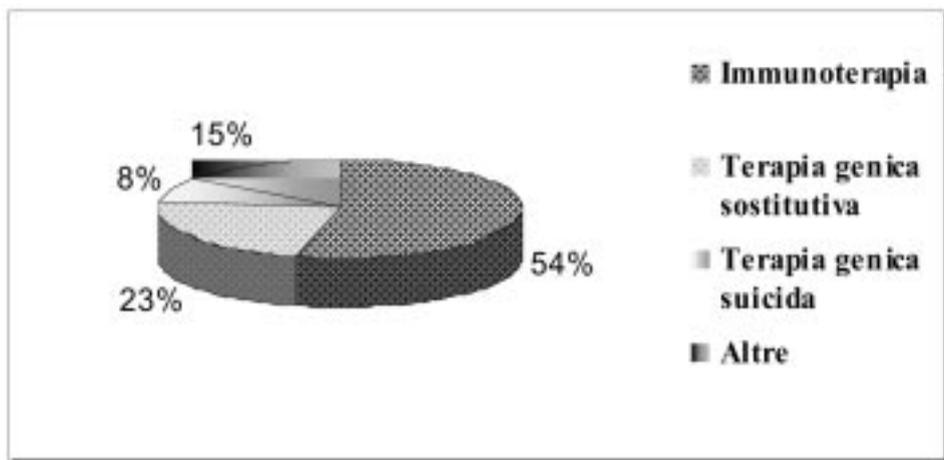


Fig. 1.

Protocolli di terapia genica attualmente in corso.

(Fonte: McCormick F. *Cancer gene therapy: fringe or cutting edge?* Nat Rev 2001;1:130-9.)

PRINCIPALI STRATEGIE DI TERAPIA GENICA APPLICATE AI TUMORI DEL DISTRETTO TESTA-COLLO

Nonostante le ancora numerose limitazioni, per così dire «tecniche», all'utilizzo della terapia genica, rappresentate essenzialmente dalla mancanza di un vettore genetico «sicuro» per il paziente, «efficace» nel veicolare il gene da trasferire nelle cellule bersaglio e nell'esprimere sufficienti quantità di proteina per lungo tempo, l'ostacolo maggiore da superare nella terapia genica dei tumori è di trovare un appropriato bersaglio molecolare. I tumori del distretto testa-collo rappresentano un buon modello di studio di applicabilità delle varie strategie di terapia genica. Infatti, come ampiamente discusso da Lamont et al. (2001)⁴⁰ il sito di queste lesioni, sia primarie che ricorrenti, è facilmente accessibile a pratiche di terapia genica in vivo, con iniezioni topiche intratumorali, senza la necessità di iniezioni sistemiche che si sono dimostrate, in studi su modelli animali, di scarsa efficacia. Altro dato importante è che le alterazioni molecolari più frequentemente riscontrate in questi tumori (mutazioni del gene p53, amplificazioni della ciclina D1, sovraespressione del recettore EGF-R) rappresentano target molecolari specifici oggetto della terapia genica sostitutiva^{46 63}. A queste considerazioni va aggiunto il fatto che l'elusione della risposta immunitaria, tipica di queste neoplasie, da ricercarsi in una down-regolazione di molecole antigeniche stimolatorie e co-stimolatorie e nella produzione anomala di molecole ad azione apoptotica per i linfociti citotossici infiltranti il tumore, alimenta le speranze della potenziale applicabilità delle strategie di immunoterapia^{28 41}.

Alla luce di queste premesse, numerosi sono gli approcci di terapia genica ed i trials clinici attualmente in studio nei carcinomi del distretto testa-collo volti a valutare l'efficacia e la sicurezza delle differenti strategie:

Terapia genica sostitutiva

Ripristino della funzione normale del gene p53. La proliferazione e la morte cellulare sono due eventi, facenti parte del normale ciclo di una cellula, finemente controllati nelle cellule normali. La regolazione di questi è da ascrivere alle numerose proteine (p53, p21, p27, p16, cicline, CDK e loro inibitori) codificate da oncogeni e geni onco-soppressori che, nell'insieme, rappresentano il circuito di controllo della replicazione cellulare. Tra tutti i meccanismi regolatori, il più frequentemente studiato, poiché più spesso alterato nelle cellule tumorali, è il gene onco-soppressore p53 deputato al controllo della divisione cellulare e della riparazione dei danni subiti dal DNA. La perdita di funzione di tale gene ha come conseguenza l'incontrollata proliferazione cellulare. Inattivazione e mutazioni del gene p53 sono state descritte nel 70% dei tumori solidi umani, con una percentuale variabile tra il 45-70% nei tumori del distretto testa-collo^{45 70}. Tali evidenze hanno fatto sì che l'approccio di terapia genica sostitutiva in queste neoplasie si focalizzassero sul ripristino della funzione normale del gene p53. I primi studi, su modelli animali, basati sull'utilizzo del «vettore genetico virale Ad-p53», un adenovirus reso incapace di replicarsi per la sostituzione del gene virale E1 con il gene p53 wild-type, hanno dimostrato chiaramente una regressione del tumore e l'instaurarsi di fenomeni apoptotici nelle cellule tumorali senza effetti significativi sulle cellule normali^{11 43 44}, fornendo così

incoraggianti evidenze che hanno portato alle successive sperimentazioni sull'uomo. A tale riguardo devono essere sottolineati i dati riportati da Clayman in una serie di trials clinici^{9 10 12 14}. Il primo trial di fase I è stato condotto su un totale di 33 pazienti affetti da carcinoma del testa-collo. Di questi, 18 pazienti, non trattabili chirurgicamente, sono stati sottoposti a tre iniezioni intratumorali a settimana per 2 settimane, gli altri 15, facenti parte del braccio chirurgico, sono stati invece sottoposti ad una settimana di trattamento seguita da una dose intra- e post-operatoria. Nel braccio chirurgico, 2 su 18 pazienti hanno mostrato una risposta parziale al trattamento, nei restanti, la malattia si è stabilizzata (n = 6) o ha mostrato segni di progressione (n = 9). Tra quelli trattati chirurgicamente, in 4 pazienti non si sono osservati segni di ripresa di malattia per un periodo di tempo compreso tra 1-3 anni. I risultati di tale studio hanno chiaramente dimostrato che l'adenovirus veicolante il gene p53 è sicuro e ben tollerato dal paziente: infatti, nonostante l'elevata risposta anticorpale verso l'adenovirus non sono stati rilevati segni di tossicità. Alla luce di questi dati preliminari oggi è in corso uno studio internazionale di fase II per valutare su una più ampia casistica di pazienti (170 casi) il suo utilizzo nel trattamento adiuvante di questi tumori.

Accanto ad un riscontro clinico importante, si deve tuttavia sottolineare, dal punto di vista biologico, la mancanza di un'evidenza diretta della proteina p53 nelle cellule tumorali infettate, attribuibile alla rapida induzione di apoptosi, come conseguenza diretta della funzionalità della proteina trasferita.

Recenti studi su modelli animali, ma non ancora sull'uomo, suggeriscono l'approccio di terapia genica sostitutiva della p53 mutata con quella normale, nel trattamento dei tumori chemio- e radio-resistenti ristabilendo la normale sensibilità al trattamento chemio- e radio-terapico^{8 57 82}. Un'evoluzione di tale strategia terapeutica sostitutiva, poiché si combina con il concetto di strategia terapeutica «suicida», è quello di modificare il vettore adenovirale (ONYX-015 modificato nella sequenza E1B-55kd deleta)² rendendolo capace di provocare selettivamente la lisi delle cellule tumorali con p53 alterata. Nonostante vi siano ancora oggi, diverse problematiche da affrontare sulla specificità d'azione di tale vettore^{23 34 37 65}, sono in corso alcuni trial clinici. Accanto ad una relativa alta percentuale di responsività, riscontrata in protocolli che prevedevano la contemporanea somministrazione di 5-fluorouracile e di cisplatino^{36 38} vi sono altri studi³⁹ in cui non si sono ottenute le risposte cliniche attese, pur dimostrando che il vettore era sicuro e ben tollerato⁵².

Ripristino della funzione normale dei geni p16, p21 e pRb. Sebbene l'attenzione sia focalizzata al ripristino della normale funzione del gene p53, si stanno valutando altri possibili target molecolari, coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, come bersagli della terapia genica. In particolare, il trasferimento genico della p16 e p21 ha dato risultati incoraggianti per i carcinomi squamosi del distretto testa-collo in modelli animali, anche se sicuramente meno efficaci di quelli ottenuti con p53^{7 13 49 62}. Tale diminuzione d'efficacia è stata confermata nell'uomo in studi su pazienti affetti da carcinoma della prostata³².

Riguardo al gene Rb, si stanno testando in modelli preclinici le potenziali applicazioni di terapie geniche in cui si utilizzano vettori adenovirali modificati nelle parti geniche (E1A o E1B) che codificano proteine virali in grado di legare la proteina Rb inattivandone la sua funzione (simili all'adenovirus modificato ONYX

015). Le forme virali modificate, mancando di tali regioni, saranno in grado di replicarsi e portare a lisi selettivamente le cellule tumorali con alterata funzione di pRb^{27 35}.

Immunoterapia

L'immunoterapia costituisce oggi una valida alternativa alla terapia genica sostitutiva ed a quella cosiddetta «suicida». Infatti, in questi due ultimi approcci vi sono, ad oggi, innumerevoli ostacoli al loro utilizzo sostenuti principalmente dalla mancanza di vettori genetici in grado di trasferire efficientemente il gene terapeutico in tutte le cellule tumorali ripristinandone la loro normale funzione. La maggiore versatilità dell'approccio immunologico, deriva dal fatto che anche se il gene è trasferito solo in una piccola percentuale di cellule si ottiene una risposta immunitaria rivolta a tutte le cellule.

Anche nel caso dell'approccio immunoterapeutico, i carcinomi del distretto testa-collo rappresentano dei validi modelli di studio. Nei pazienti affetti da questa patologia, infatti, vi è un notevole deficit della risposta immunitaria da parte di cellule NK e linfociti T, con conseguente alterata produzione di citochine e linfocine riscontrabile anche nel sito del tumore primario e nei linfonodi regionali. Questa deplezione è inoltre sostenuta dalla capacità delle cellule tumorali di produrre sostanze citotossiche^{19 75 76} e dall'azione della chemio- e radio-terapia⁸⁰.

I primi approcci, anche se con risultati non eclatanti, volti a stimolare la risposta immunitaria di pazienti affetti da carcinomi del distretto testa-collo, si basavano sull'utilizzo del bacillo di Calmette-Guerin, in associazione al metotrexate^{55 73}.

La tecnica dell'immunoterapia è oggi basata su due principali e differenti strategie: la prima, consiste nel rafforzare la risposta immunitaria somministrando direttamente nel sito tumorale, alcune citochine in grado di attivare la risposta immunitaria o, modificando geneticamente le cellule e rendendole capaci di produrre tali citochine. La seconda, detta anche vaccino-terapia, consiste invece nel rendere le cellule tumorali più immunogeniche, trasferendo in esse geni che codificano antigeni del complesso MHC, antigeni tumorali o antigeni estranei (alloantigeni), tutti in grado di rafforzarne il riconoscimento da parte dei linfociti T.

Immunoterapia con IL-2. La prima strategia immunoterapeutica si è focalizzata sull'utilizzo dell'interleuchina 2. L'IL-2 è una citochina ad azione anti-tumorale indiretta, essendo in grado di interferire con la crescita neoplastica grazie alla sua potente attività di stimolo su diversi effettori del sistema immunitario. L'immunoterapia condotta con IL-2, proprio per la sua azione di stimolo ad ampio spettro sul sistema immunitario, è definita come «attiva aspecifica». Esperimenti di somministrazione dell'IL-2 in modelli animali hanno dimostrato chiaramente una regressione del tumore e i numerosi protocolli basati sull'utilizzo dell'IL-2 nel trattamento dei tumori del distretto testa-collo hanno mostrato che, effettivamente, l'IL-2 prodotta stimolava l'attività delle cellule NK e dei linfociti T^{48 60 78}. In particolare i primi buoni risultati furono ottenuti dal gruppo di Rosenberg nel 1987⁶⁴ presso il National Cancer Institute di Bethesda, su melanomi e carcinomi a cellule chiare del rene, usando IL-2 ad alte dosi e cellule LAK: si ottennero tutta una serie di risposte complete e parziali con l'unico limite di una notevole tossicità del trattamento. Il

gruppo di Cortesina, ha ottenuto buoni risultati nei pazienti affetti da carcinoma squamoso della testa e del collo, usando il trattamento loco-regionale (con iniezione della citochina nella catena linfonodale) a basse dosi (500, 1000, 5000 UI) di IL-2, basandosi sugli ottimi risultati ottenuti da Forni (1985)²⁵, sui topi. In studi di fase I e II si sono ottenute alcune CR e numerose PR iniettando basse dosi di IL-2 in HNSCC non più passibili di altro trattamento, con assenza totale di tossicità¹⁵⁻¹⁸. Si ipotizzò un razionale che prevedeva IL-2 loco-regionale per «eradicare» la minimal residual disease (m.r.d.) in tumori avanzati ad alto rischio di m.r.d., dopo chirurgia ed eventuale radioterapia, quali sono i carcinomi del cavo orale e orofaringe. Si disegnò uno studio randomizzato a due bracci, in tumori di queste sedi in stadio III e IV, che comprendeva 220 pazienti: il primo braccio comprendeva chirurgia più radioterapia, il secondo braccio IL-2 loco-regionale più chirurgia più radioterapia più somministrazione di IL-2 (5 giorni al mese per 12 mesi). Il braccio con IL-2 mostrò un significativo ($p < 0,05$) miglioramento di sopravvivenza media ed un minor numero di recidive ($p < 0,01$)²².

Al contrario, i primi approcci di terapia genica basati sul trasferimento del gene codificante l'IL-2 mediante vettori adenovirali, non hanno mostrato, in modelli animali, risultati incoraggianti⁴²⁻⁵⁴.

Immunoterapia con IL-12. Recenti studi in modelli animali stanno testando l'efficacia della terapia genica con vettori virali in grado di veicolare il gene dell'IL-12 da sola o in associazione all'IL-2. L'IL-12 è una citochina prodotta normalmente dai macrofagi che, da sola o in sinergia con l'IL-2, è in grado di stimolare l'attività delle cellule NK, dei linfociti T e di indurne il rilascio di altre citochine stimolatorie.

I risultati incoraggianti ottenuti nei modelli animali hanno indotto all'avvio di un trial di fase I in pazienti affetti da carcinomi del distretto testa-collo⁵⁰.

Vaccinoterapia. Allo scopo di evitare le complicazioni dovute alla tossicità dopo somministrazione di citochine, si sono evolute strategie di terapia genica mirate al rafforzamento della risposta immunitaria specifica, indotta selettivamente da antigeni, o prodotti genici noti, espressi dalle cellule tumorali. La vaccinoterapia può quindi essere definita una forma di terapia «attiva specifica» mediata dall'attivazione del sistema immunitario contro un antigene bersaglio noto espresso dalle cellule neoplastiche. Scopo di questa forma di terapia è stimolare la risposta cellulo-mediata dei linfociti CTL e dei T helper, determinando nei pazienti una risposta immunitaria che scateni un attacco nei confronti delle cellule tumorali. Sperimentalmente si cerca di raggiungere tale obiettivo attraverso vaccinazioni con peptidi o frammenti immunogenici (costituiti da cellule tumorali autologhe, allogene e geneticamente modificate o da derivati dalla lisi di cellule tumorali o antigeni tumore-associati) che, complessati e processati con molecole HLA di classe I vengono riconosciuti dai linfociti CTL e li attivano, oppure, complessati con molecole HLA di classe II presenti sulla membrana di cellule APC specializzate nel presentare gli antigeni ai linfociti T helper (cellule dendritiche, macrofagi e monociti) li inducono a produrre citochine immunostimolanti.

I recenti studi nel campo dell'immunologia dei tumori hanno portato all'identificazione ed alla caratterizzazione molecolare di antigeni tumore-associati (TAA tumor-associated protein antigen) che sono riconosciuti dai linfociti T quando asso-

ciati agli antigeni HLA di classe I. I vaccini in corso di valutazione sono costituiti prevalentemente da antigeni tumore-associati (peptidi TAA espressi dal tumore ma non dalle cellule normali) associati o meno a sostanze adiuvanti (citochine come GM-CSF) o a segnali di co-stimolazione (come B7). I tumori del distretto testa-collo esprimono una pleora di antigeni specifici che rappresentano potenziali target dell'immunoterapia (squamous cell carcinoma antigen (SCCAg), cytocheratin fragment 19 (CYFRA 21-1), MAGE, Casp-8 etc.)^{59 71 83} ma, ad oggi, i protocolli sperimentali di terapia genica sono focalizzati su una specifica strategia. Questa si caratterizza per il trasferimento nelle cellule tumorali di geni codificanti antigeni di istocompatibilità di classe I (MHC) anche diversi da quelli individuali («alloantigeni»). Il razionale di tale strategia terapeutica si basa sull'osservazione che, in questi pazienti, la diminuita espressione di molecole del complesso MHC di classe I impedisce il riconoscimento degli antigeni tumorali ad esso associati da parte dei linfociti CTL. Poiché numerose sperimentazioni, in vitro su linee cellulari tumorali o, in vivo su modelli animali, avevano già dimostrato l'efficacia di questo nuovo approccio^{33 45 72}, proprio su questo concetto si basano le sperimentazioni cliniche in corso nei pazienti affetti da carcinomi del distretto testa-collo con l'allovectina-7, un vettore liposomiale contenente un plasmide che codifica l'antigene HLA-B7 del MHC I^{29 56}. In particolare, recentemente Gleich (2000)³⁰ ha fornito i primi risultati di un trial di fase I condotto su 20 pazienti trattati con allovectina-7. I tumori trattati una volta a settimana per due settimane, per un totale di due cicli, a differenza dei casi trattati con un solo ciclo, non mostravano segni di progressione della malattia. Dato importante per la valutazione dell'efficacia di tale trattamento fu la determinazione dell'espressione di HLA-B7 nelle cellule dei pazienti, l'aumento di apoptosi e la mancanza di effetti tossici del farmaco da ascrivere all'utilizzo di un vettore non virale.

Vaccini a DNA. La vaccinazione a DNA è una tecnologia che si basa sulla somministrazione di DNA nudo che codifichi per un antigene tumorale o una molecola costimolatoria delle cellule T. L'idea è che il DNA sia assorbito ed espresso dalle cellule a livello del sito di iniezione. Tale strategia, poiché non prevede l'utilizzazione di vettori virali per veicolare il DNA, potrebbe rivelarsi la più sicura tra i diversi approcci basati sul DNA.

Nella messa a punto di vaccini a DNA antitumore la scelta dell'antigene bersaglio è di importanza cruciale. Sulla base di questo principio, il gruppo di Forni (Torino)^{3 66}, ha messo a punto, in modelli animali, un vaccino a DNA che ha come bersaglio la proteina di membrana p185^{neu}, prodotto del gene Her-2/neu (ErbB-2), direttamente coinvolta nella trasformazione neoplastica di un gran numero di carcinomi^{20 24 61}. In seguito a mutazione o ad amplificazione la p185^{neu} si aggrega in omo- o etero-dimeri che trasducono segnali di attivazione alla cellula neoplastica. L'efficacia di tale vaccino è stata valutata in topi transgenici per l'oncogene trasformante Her-2/neu di ratto, geneticamente predestinati a sviluppare tumori mammari. In questi topi è stato dimostrato che la vaccinazione con plasmidi di DNA, che codificavano solo per la porzione per così dire «buona» della p185^{neu} (l'epitope in grado di indurre risposte protettive, privato della porzione trasduttrice del segnale di attivazione della cellula neoplastica), era in grado di attivare una risposta immunitaria, nei topi transgenici per l'oncogene trasformante, che proteggeva il 50% delle femmine

inibendone lo sviluppo di tumori mammari^{51 67}. La tecnica di elettroporazione in vivo dei plasmidi a DNA associata alla somministrazione di molecole di stimolazione o citochine è risultata, in successivi esperimenti, particolarmente efficace nell'inibire la progressione della cancerogenesi, anche a partire da lesioni preneoplastiche avanzate. I dati forniti dagli studi di Forni (Dipartimento di Oncologia – COES Molinette di Torino) costituiranno il punto di partenza per l'allestimento di protocolli di vaccinazione a DNA, in condizione adiuvante, in pazienti portatori di carcinomi ErbB-2 positivi. Inizialmente l'intento sarà di prevenire o ritardare le ricorrenze e la diffusione metastatica di tumori particolarmente aggressivi, esperimenti ErbB-2, quali quelli del distretto cervico-facciale^{69 77 81}. In particolare, l'efficacia di tale vaccino sarà valutata nei pazienti operati di carcinomi stadio III-IV, Her/neu (ErbB-2) positivi, del cavo orale, orofaringe e laringe ad evoluzione faringea, per prevenire le ricorrenze in pazienti che pur avendo risposto alla terapia, possono trovarsi in condizioni di malattia minima residua. L'obiettivo successivo, da affrontare solo quando saranno disponibili i primi dati sui pazienti neoplastici trattati, sarà di utilizzare questa forma di vaccinazione per bloccare la progressione delle lesioni preneoplastiche.

Terapia genica «suicida»

Questa strategia si basa sul principio dell'introduzione di un gene suicida all'interno di una cellula tumorale. In altri termini, l'introduzione di un gene il cui prodotto si identifichi con una proteina ad attività enzimatica che renda la cellula in grado di attivare un pro-farmaco a farmaco citotossico in grado di ucciderla. Un esempio di questa tecnica è il trasferimento nella cellula tumorale del gene della timidina-chinasi dell'Herpes simplex virus (HSV-tk). Questo gene determina la fosforilazione dell'analogo nucleotidico non tossico del ganciclovir interferendo con la trascrizione del DNA nelle cellule in divisione⁴⁶. A tale proposito va menzionato il cosiddetto «effetto spettatore» (bystander) consistente nella morte delle cellule tumorali situate in prossimità di quelle suicide²⁶ a causa del trasferimento da cellula a cellula del farmaco tossico. L'efficacia di questa strategia nel trattamento dei tumori del tratto testa-collo è stata dimostrata solo in modelli animali^{31 53 68 79}. Per altri siti tumorali, quali, ovaio, prostata, cervello, colon, vescica e melanoma, sono in corso trials clinici anche sull'uomo³⁰. Tali studi, nell'insieme, nonostante i risultati positivi ottenuti in modelli animali, hanno dato risultati poco incoraggianti per il limitato periodo di regressione del tumore osservato e per gli effetti collaterali conseguenti al trattamento.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Le sperimentazioni, in modelli animali e nell'uomo, delle varie strategie di terapia genica (terapia genica sostitutiva, terapia genica «suicida», terapia antisense e immunoterapia), costituiscono un ambito sperimentale sicuramente affascinante e basato su razionali decisamente interessanti: esse sono state fatte su vari tipi di tumori tra i quali annoveriamo gli HNSCC. Trattasi ovviamente, sull'uomo, di studi in fase I e II, i quali ci possono delineare dei «trends» d'efficacia, mentre mancano

gli studi randomizzati. Nessun messaggio definitivo si può ad oggi derivare, dalle strategie di terapia genica, mentre qualcosa di più si può dire a proposito dell'immunoterapia. L'esistenza di uno studio randomizzato riguardante gli HNSCC (carcinomi del cavo orale e orofaringe) con risultati che presentano una discreta significatività statistica, impiegando IL-2 loco-regionale a basse dosi neo-adiuvante e adjuvante a chirurgia + radioterapia, ci induce a ritenere decisamente percorribile e sviluppabile la strada dell'immunoterapia con citochine e quella che si sta aprendo all'era dei vaccini. Qualora questi ultimi ci fornissero buoni o anche solamente discreti risultati, in assenza di tossicità o di promozione tumorale, si potrà pensare ad un loro futuro, e più razionale, utilizzo nel campo delle precancerosi e delle categorie di pazienti a forte rischio.

Si può meditare sul fatto che finora, ad una grande mole di ricerche molecolari non corrispondono altrettanti rilevanti successi terapeutici: questa è la prova che la biologia dei tumori è quanto mai complessa, una serie di fattori interagenti tra di loro, che cambiano nel tempo e nei singoli individui, rendono difficili schematizzazioni o semplificazioni di tipo terapeutico.

Riteniamo però che anche gli insuccessi clinici abbiano una loro valenza scientifica, e possono portare ad approfondimenti teorici e conoscitivi, che potrebbero in futuro, aprirci alcune soluzioni di alcuni problemi oncologici clinici.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Anderson WF. *Human gene therapy*. Nature 1998;392(Suppl):25-30. Review.
- ² Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, et al. *An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells*. Science 1996;274:373-6.
- ³ Boggio K, Nicoletti G, Di Carlo E, Cavallo F, Landuzzi L, Melani C, et al. *Interleukin 12-mediated prevention of spontaneous mammary adenocarcinomas in two lines of Her-2/neu transgenic mice*. J Exp Med 1998;188:589-96.
- ⁴ Boyle JO, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban RH, et al. *The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer*. Cancer Res 1993;53:4477-80.
- ⁵ Caamano J, Zhang SY, Rosvold EA, Bauer B, Klein-Szanto AJ. *p53 alterations in human squamous cell carcinomas and carcinoma cell lines*. Am J Pathol 1993;142:1131-9.
- ⁶ Callender T, el-Naggar AK, Lee MS, Frankenthaler R, Luna MA, Batsakis JG. *PRAD-1 (CCND1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer 1994;74:152-8.
- ⁷ Cardinali M, Jakus J, Shah S, Ensley JF, Robbins KC, Yeudall WA. *p21(WAF1/Cip1) retards the growth of human squamous cell carcinomas in vivo*. Oral Oncol 1998;34:211-8.
- ⁸ Chang EH, Jang YJ, Hao Z, Murphy G, Rait A, Fee WE Jr, et al. *Restoration of the G1 checkpoint and the apoptotic pathway mediated by wild-type p53 sensitizes squamous cell carcinoma of the head and neck to radiotherapy*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1997;123:507-12.
- ⁹ Clayman GL, Dreiling LK. *Injectable modalities as local and regional strategies for head and neck cancer*. Hematol Oncol Clin North Am 1999;13:787-810. Review.
- ¹⁰ Clayman GL, el-Naggar AK, Lippman SM, Henderson YC, Frederick M, Merritt JA, et al. *Adenovirus-mediated p53 gene transfer in patients with advanced recurrent head and neck squamous cell carcinoma*. J Clin Oncol 1998;16:2221-32.
- ¹¹ Clayman GL, el-Naggar AK, Roth JA, Zhang WW, Goepfert H, Taylor DL, et al. *In vivo molecular therapy with p53 adenovirus for microscopic residual head and neck squamous carcinoma*. Cancer Res 1995;55:1-6.
- ¹² Clayman GL, Frank DK, Brusio PA, Goepfert H. *Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer as a surgical adjuvant in advanced head and neck cancers*. Clin Cancer Res 1999;5:1715-22.

- ¹³ Clayman GL, Liu TJ, Overholt SM, Mobley SR, Wang M, Janot F, et al. *Gene therapy for head and neck cancer. Comparing the tumor suppressor gene p53 and a cell cycle regulator WAF1/CIP1 (p21)*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1996;122:489-93.
- ¹⁴ Clayman GL. *The current status of gene therapy*. Semin Oncol 2000;27(Suppl 8):39-43. Review.
- ¹⁵ Cortesina G, De Stefani A, Galeazzi E, Bussi M, Giordano C, Cavallo GP, et al. *The effect of preoperative local interleukin-2 (IL-2) injections in patients with head and neck squamous cell carcinoma. An immunological study*. Acta Otolaryngol 1991;111:428-33.
- ¹⁶ Cortesina G, De Stefani A, Galeazzi E, Cavallo GP, Badellino F, Margarino G, et al. *Temporary regression of recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck is achieved with a low but not with a high dose of recombinant interleukin 2 injected perilymphatically*. Br J Cancer 1994;69:572-6.
- ¹⁷ Cortesina G, De Stefani A, Galeazzi E, Cavallo GP, Jemma C, Giovarelli M, et al. *Interleukin-2 injected around tumor-draining lymph nodes in head and neck cancer*. Head Neck 1991;13:125-31.
- ¹⁸ Cortesina G, De Stefani A, Giovarelli M, Barioglio MG, Cavallo GP, Jemma C, et al. *Treatment of recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck with low doses of interleukin-2 injected perilymphatically*. Cancer 1988;62:2482-5.
- ¹⁹ Cortesina G, Sacchi M, Galeazzi E, De Stefani A. *Immunology of head and neck cancer: perspectives*. Head Neck 1993;15:74-7. Review.
- ²⁰ Craven JM, Pavelic ZP, Stambrook PJ, Pavelic L, Gapany M, Kelley DJ, et al. *Expression of c-erbB-2 gene in human head and neck carcinoma*. Anticancer Res 1992;12:2273-6.
- ²¹ Cusack JC Jr, Tanabe KK. *Cancer gene therapy*. Surg Oncol Clin N Am 1998;7:421-69. Review.
- ²² De Stefani A, Forni G, Ragona R, Cavallo G, Bussi M, Usai A, et al. *Improved survival with perilymphatic interleukin 2 in patients with respectable squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx*. Cancer 2002;95:90-7.
- ²³ Dix BR, Edwards SJ, Braithwaite AW. *Does the antitumor adenovirus ONYX-015/dl1520 selectively target cells defective in the p53 pathway?* J Virol 2001;75:5443-7. Review.
- ²⁴ Field JK, Spandidos DA, Yiagnisis M, Gosney JR, Papadimitriou K, Stell PM. *C-erbB-2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck*. Anticancer Res 1992;12:613-9.
- ²⁵ Forni G, Giovarelli M, Santoni A. *Lymphokine-activated tumor inhibition in vivo. I. The local administration of interleukin 2 triggers nonreactive lymphocytes from tumor-bearing mice to inhibit tumor growth*. J Immunol 1985;134:1305-11.
- ²⁶ Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, et al. *The «by-stander effect»: tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified*. Cancer Res 1993;53:5274-83.
- ²⁷ Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R, Lee PS, McDonnell TJ, Mitlianga P, et al. *A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo*. Oncogene 2000;19:2-12.
- ²⁸ Gastman BR, Atarshi Y, Reichert TE, Saito T, Balkir L, Rabinowich H, et al. *Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes*. Cancer Res 1999;59:5356-64.
- ²⁹ Gleich LL, Gluckman JL, Armstrong S, Biddinger PW, Miller MA, Balakrishnan K, et al. *Alloantigen gene therapy for squamous cell carcinoma of the head and neck: results of a phase-1 trial*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1998;124:1097-104.
- ³⁰ Gleich LL. *Gene therapy for head and neck cancer*. Laryngoscope 2000;110:708-26. Review.
- ³¹ Goebel EA, Davidson BL, Graham SM, Kern JA. *Tumor reduction in vivo after adenoviral mediated gene transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir treatment in human head and neck squamous cell carcinoma*. Otolaryngol Head Neck Surg 1998;119:331-6.
- ³² Gotoh A, Kao C, Ko SC, Hamada K, Liu TJ, Chung LW. *Cytotoxic effects of recombinant adenovirus p53 and cell cycle regulator genes (p21 WAF1/CIP1 and p16CDKN4) in human prostate cancers*. J Urol 1997;158:636-41.
- ³³ Hammerling GJ, Klar D, Katzav S, Segal S, Feldman M, Wallich R, et al. *Manipulation of metastasis and tumour growth by transfection with histocompatibility class I genes*. J Immunogenet 1986;13:153-7.
- ³⁴ Harada JN, Berk AJ. *p53-Independent and -dependent requirements for E1B-55K in adenovirus type 5 replication*. J Virol 1999;73:5333-44.

- 35 Heise C, Hermiston T, Johnson L, Brooks G, Sampson-Johannes A, Williams A, et al. *An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy*. *Nat Med* 2000;6:1134-9.
- 36 Heise C, Sampson-Johannes A, Williams A, McCormick F, Von Hoff DD, Kirn DH. *ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents*. *Nat Med* 1997;3:639-45.
- 37 Heise CC, Williams A, Olesch J, Kirn DH. *Efficacy of a replication-competent adenovirus (ONYX-015) following intratumoral injection: intratumoral spread and distribution effects*. *Cancer Gene Ther* 1999;6:499-504.
- 38 Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L, et al. *A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer*. *Nat Med* 2000;6:879-85.
- 39 Kirn D, Nemunaitis J, Ganly I et al. *A phase II trial of intratumoral injection with an E1B-deleted adenovirus ONYX-015, in patients with recurrent, refractory head and neck cancer (abstract 1509)*. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1998;17:391a.
- 40 Lamont JP, Kuhn JA, Nemunaitis JJ, McCarty TM. *Gene therapy for head and neck cancers*. *Oncology (Huntingt)*. 2001;15:303-8; discussion 311-4. Review.
- 41 Lang S, Whiteside TL, Lebeau A, Zeidler R, Mack B, Wollenberg B. *Impairment of T-cell activation in head and neck cancer in situ and in vitro: strategies for an immune restoration*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;125:82-8.
- 42 Li D, Duan L, Freimuth P, O'Malley BW Jr. *Variability of adenovirus receptor density influences gene transfer efficiency and therapeutic response in head and neck cancer*. *Clin Cancer Res* 1999;5:4175-81.
- 43 Liu TJ, el-Naggar AK, McDonnell TJ, Steck KD, Wang M, Taylor DL, et al. *Apoptosis induction mediated by wild-type p53 adenoviral gene transfer in squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Cancer Res* 1995;55:3117-22.
- 44 Liu TJ, Zhang WW, Taylor DL, Roth JA, Goepfert H, Clayman GL. *Growth suppression of human head and neck cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene via a recombinant adenovirus*. *Cancer Res* 1994;54:3662-7.
- 45 Ljunggren HG, Karre K. *Experimental strategies and interpretations in the analysis of changes in MHC gene expression during tumour progression. Opposing influences of T cell and natural killer mediated resistance?* *J Immunogenet* 1986;13:141-51.
- 46 Matthews T, Boehme R. *Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir*. *Rev Infect Dis* 1988;10(Suppl 3):S490-4. Review.
- 47 McCormick F. *Cancer gene therapy: fringe or cutting edge?* *Nat Rev Cancer* 2001;1:130-41. Review.
- 48 Melioli G, Margarino G, Scala M, Mereu P, Bertoglio S, Schenone G, et al. *Perilymphatic injections of recombinant interleukin-2 (rIL-2) partially correct the immunologic defects in patients with advanced head and neck squamous cell carcinoma*. *Laryngoscope* 1992;102:572-8.
- 49 Mobley SR, Liu TJ, Hudson JM, Clayman GL. *In vitro growth suppression by adenoviral transduction of p21 and p16 in squamous cell carcinoma of the head and neck: a research model for combination gene therapy*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:88-92.
- 50 Myers JN, Mank-Seymour A, Zitvogel L, Storkus W, Clarke M, Johnson CS, et al. *Interleukin-12 gene therapy prevents establishment of SCC VII squamous cell carcinomas, inhibits tumor growth, and elicits long-term antitumor immunity in syngeneic C3H mice*. *Laryngoscope* 1998;108:261-8.
- 51 Nanni P, Nicoletti G, De Giovanni C, Landuzzi L, Di Carlo E, Cavallo F, et al. *Combined allogeneic tumor cell vaccination and systemic interleukin 12 prevents mammary carcinogenesis in HER-2/neu transgenic mice*. *J Exp Med* 2001;194:1195-205.
- 52 Nemunaitis J, Khuri F, Ganly I, Arseneau J, Posner M, Vokes E, et al. *Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer*. *J Clin Oncol* 2001;19:289-98.
- 53 O'Malley BW Jr, Chen SH, Schwartz MR, Woo SL. *Adenovirus-mediated gene therapy for human head and neck squamous cell cancer in a nude mouse model*. *Cancer Res* 1995;55:1080-5.
- 54 O'Malley BW Jr, Li D, Buckner A, Duan L, Woo SL, Pardoll DM. *Limitations of adenovirus-mediated interleukin-2 gene therapy for oral cancer*. *Laryngoscope* 1999;109:389-95.

- 55 Papac R, Minor DR, Rudnick S, Solomon LR, Capizzi RL. *Controlled trial of methotrexate and Bacillus Calmette-Guerin therapy for advanced head and neck cancer*. *Cancer Res* 1978;38:3150-3.
- 56 Parker SE, Vahlsing HL, Serfilippi LM, Franklin CL, Doh SG, Gromkowski SH, et al. *Cancer gene therapy using plasmid DNA: safety evaluation in rodents and non-human primates*. *Hum Gene Ther* 1995;6:575-90.
- 57 Pirolo KF, Hao Z, Rait A, Jang YJ, Fee WE Jr, Ryan P, et al. *p53 mediated sensitization of squamous cell carcinoma of the head and neck to radiotherapy*. *Oncogene* 1997;14:1735-46.
- 58 Plautz GE, Yang ZY, Wu BY, Gao X, Huang L, Nabel GJ. *Immunotherapy of malignancy by in vivo gene transfer into tumors*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4645-9.
- 59 Quillien V, Raoul JL, Heresbach D, Collet B, Toujas L, Brasseur F. *Expression of MAGE genes in esophageal squamous-cell carcinoma*. *Anticancer Res* 1997;17:387-91.
- 60 Rabinowich H, Vitolo D, Altarac S, Herberman RB, Whiteside TL. *Role of cytokines in the adoptive immunotherapy of an experimental model of human head and neck cancer by human IL-2-activated natural killer cells*. *J Immunol* 1992;149:340-9.
- 61 Riviere A, Becker J, Loning T. *Comparative investigation of *cerbB2/neu* expression in head and neck tumors and mammary cancer*. *Cancer* 1991;67:2142-9.
- 62 Rocco JW, Li D, Liggett WH Jr, Duan L, Saunders JK Jr, Sidransky D, et al. *p16INK4A adenovirus-mediated gene therapy for human head and neck squamous cell cancer*. *Clin Cancer Res* 1998;4:1697-704.
- 63 Rodrigo JP, Ramos S, Lazo PS, Alvarez I, Suarez C. *Amplification of ERBB oncogenes in squamous cell carcinomas of the head and neck*. *Eur J Cancer* 1996;32A:2004-10.
- 64 Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, et al. *Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer*. *N Engl J Med* 1985;313:1485-92.
- 65 Rothmann T, Hengstermann A, Whitaker NJ, Scheffner M, zur Hausen H. *Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells*. *J Virol* 1998;72:9470-8.
- 66 Rovero S, Amici A, Carlo ED, Bei R, Nanni P, Quaglino E, et al. *DNA vaccination against rat *her-2/Neu p185* more effectively inhibits carcinogenesis than transplantable carcinomas in transgenic BALB/c mice*. *J Immunol* 2000;165:5133-42.
- 67 Rovero S, Boggio K, Carlo ED, Amici A, Quaglino E, Porcedda P, et al. *Insertion of the DNA for the 163-171 peptide of IL1beta enables a DNA vaccine encoding p185(neu) to inhibit mammary carcinogenesis in *Her-2/neu* transgenic BALB/c mice*. *Gene Ther* 2001;8:447-52.
- 68 Sewell DA, Li D, Duan L, Westra WH, O'Malley BW Jr. *Safety of in vivo adenovirus-mediated thymidine kinase treatment of oral cancer*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:1298-302.
- 69 Shiga H, Rasmussen A, Patrick MS, et al. *Prognostic value of *c-erbB2* and other markers in patients treated with chemotherapy for recurrent head and neck cancer*. *Head and Neck* 2000;22:599-608.
- 70 Shin DM, Lee JS, Lippman SM, Lee JJ, Tu ZN, Choi G, et al. *p53 expressions: predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell carcinoma*. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:519-29.
- 71 Snyderman CH, D'Amico F, Wagner R, Eibling DE. *A reappraisal of the squamous cell carcinoma antigen as a tumor marker in head and neck cancer*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;121:1294-7.
- 72 Tanaka K, Isselbacher KJ, Khoury G, Jay G. *Reversal of oncogenesis by the expression of a major histocompatibility complex class I gene*. *Science* 1985;228:26-30.
- 73 Taylor SG 4th, Sisson GA, Bytell DE, Raynor WJ Jr. *A randomized trial of adjuvant BCG immunotherapy in head and neck cancer*. *Arch Otolaryngol* 1983;109:544-9.
- 74 Verma IM, Somia N. *Gene therapy: promises, problems and prospects*. *Nature* 1997;389:239-42.
- 75 Vitolo D, Letessier EM, Johnson JT, Whiteside TL. *Immunologic effector cells in head and neck cancer*. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1992;13:203-8.
- 76 Wang MB, Lichtenstein A, Mickel RA. *Hierarchical immunosuppression of regional lymph nodes in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1991;105:517-27.

- ⁷⁷ Werkmeister R, Brandt B, Joss U. *Clinical relevancer of erbB-1 and -2 oncogenes in oral carcinomas*. Oral Oncology 2000;36:100-5.
- ⁷⁸ Whiteside TL, Letessier E, Hirabayashi H, Vitolo D, Bryant J, Barnes L, et al. *Evidence for local and systemic activation of immune cells by peritumoral injections of interleukin 2 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck*. Cancer Res 1993;53:5654-62.
- ⁷⁹ Wilson KM, Stambrook PJ, Bi WL, Pavelic ZP, Pavelic L, Gluckman JL. *HSV-tk gene therapy in head and neck squamous cell carcinoma. Enhancement by the local and distant bystander effect*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1996;122:746-9.
- ⁸⁰ Wolf GT, Amendola BE, Diaz R, Lovett EJ 3rd, Hammerschmidt RM, Peterson KA. *Definite vs adjuvant radiotherapy. Comparative effects on lymphocyte subpopulations in patients with head and neck squamous carcinoma*. Arch Otolaryngol 1985;111:716-26.
- ⁸¹ Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Liu AR, Li L, Kiyokawa N, et al. *Strong correlation between c-erbB-2 overexpression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res 1997;3:3-9.
- ⁸² Xu L, Pirolo KF, Tang WH, Rait A, Chang EH. *Transferrin-liposome-mediated systemic p53 gene therapy in combination with radiation results in regression of human head and neck cancer xenografts*. Hum Gene Ther 1999;10:2941-52.
- ⁸³ Yen TC, Lin WY, Kao CH, Cheng KY, Wang SJ. *A study of a new tumour marker, CYFRA 21-1, in squamous cell carcinoma of the head and neck, and comparison with squamous cell carcinoma antigen*. Clin Otolaryngol 1998;23:82-6.

CONCLUSIONI

G. Cortesina

Il riuscire a definire, in ciascun paziente con tumore cervico-cefalico, un profilo di caratteristiche prognostiche di vario tipo, cliniche e biologiche, sufficientemente validate da presupposti sperimentali, rappresenta un passo avanti notevole nei tentativi di ottimizzare l'approccio al malato oncologico. Il conoscerne in anticipo, con ragionevole sicurezza, i rischi di andare incontro a recidive o di peggiorare la sopravvivenza, permette di attivare alcune accortezze diagnostiche, quale quella rappresentata da un follow-up più accurato e ravvicinato nel tempo, o di attuare procedimenti d'integrazione terapeutica che aumentino le possibilità di controllo locale e di eradicazione della minimal residual disease (mrd) che è la causa principale di recidiva o di metastatizzazione.

Il sapere, o ragionevolmente presupporre, in partenza che il nostro paziente è maggiormente a rischio di recidiva e come tale è gravato da una possibilità minore di sopravvivenza condiziona il follow-up, come si è detto, nel senso dell'accuratezza e dei controlli ravvicinati e inoltre nel senso di un maggior e ravvicinato utilizzo dell'imaging (TC, RNM), delle panendoscopie in narcosi con l'uso del microscopio e di prelievi biotipici multipli. L'integrazione terapeutica, in presenza di alcuni fattori prognostici negativi, è opportuno che venga definita in maniera collegiale con chirurgo, radioterapista, oncologo medico, anatomo-patologo, chirurgo plastico-ricostruttivo e odontoiatra.

Il bilancio dei fattori prognostici diventa un fatto di identificazione personalizzata della situazione oncologica reale del singolo paziente, e quindi va fatto servendosi dell'esperienza dei singoli specialisti, per arrivare ad una scelta di integrazione terapeutica il più meditata possibile. La definizione precisa dello stadio di T e di N, l'aspetto macroscopico della lesione saranno i primi fattori che condizionaeranno l'approccio chirurgico di tipo conservativo, demolitivo semplice o demolitivo con lembo plastico-ricostruttivo. A questa andrà affiancata la definizione di tutti i fattori prognostici generali (malattie concomitanti, performance status etc.) e che potranno in certi casi controindicare ad esempio una chirurgia ricostruttiva, oppure di lembi e d'interposizione di visceri che potrebbero rivelarsi interventi troppo «pesanti» per il paziente. Gli stessi fattori generali potrebbero controindicare la chirurgia in genere e indicare una radioterapia anche se a scopo palliativo.

La programmazione chirurgica a questo punto deve essere fatta congiuntamente con il chirurgo plastico-ricostruttivo, designando a priori una specie di «progetto» del lembo che si vuole utilizzare. E come pure sarà necessario l'intervento del-

l'odontoiatra che dovrà decidere se è il caso di fare una bonifica dentaria (in previsione di una radioterapia post-operatoria) oppure programmare (in interventi per tumori del cavo orale e dell'orofaringe) protesizzazioni o impianti per cercare di ripristinare la funzione masticatoria.

La scelta di una radioterapia esclusiva o di una bradicurieterapia, dovrà necessariamente tenere conto di alcuni fattori prognostici che riguardano la sede, il volume del tumore (< 2-3 cm di diametro), la sua tipologia macroscopica (vegetante e non infiltrativo) e inoltre le condizioni dell'N.

Essa potrà inoltre avvalersi di nuovi fattori prognostici biologici, che la ricerca attuale ci offre e di cui si è ampiamente parlato nei capitoli precedenti (Capp. 4, 6 e 8).

La scelta di una radioterapia (o radiochemioterapia) esclusiva è finalizzata ad una filosofia di preservazione d'organo, vale per alcune sedi, come cavo orale (bradicurieterapia), orofaringe, ipofaringe e laringe, e deve comunque prevedere e quindi programmare, una chirurgia di recupero. Nei protocolli di preservazione d'organo della laringe e dell'ipofaringe-laringe, la risposta alla chemioterapia (protocollo di Al Sarraf) dopo 2-3 cicli è il fattore prognostico che ci fa indicare la radioterapia.

Deriva dall'esposizione di questi concetti che l'azione congiunta di chirurgo, radioterapista e oncologo medico, che fanno una sorta di «bilanciamento critico» di tutti i fattori prognostici, rappresenta il momento cruciale per la scelta del tipo di terapia. Come l'azione congiunta di chirurgo, radioterapista, oncologo medico e anatomo-patologo, sarà fondamentale nella valutazione dei fattori prognostici anatomo-patologici (oltre che clinici) che derivano dallo studio istopatologico dei pezzi operatori (pTNM) e nell'indicazione di una radioterapia post-operatoria, a dosi che sono state ormai codificate in alcuni protocolli.

Nel nostro gruppo valutiamo inoltre, in sede di visita collegiale, in casi di tumori del cavo orale e dell'orofaringe, la possibilità di impiegare l'infiltrazione loco-regionale con Interleuchina 2 (IL2) a basse dosi prima e dopo l'intervento (a cicli mensili per un anno): tale possibilità è strettamente legata alla possibilità di risparmiare una catena linfonodale di un lato in sede d'intervento chirurgico (in base alle caratteristiche di T ed N), in quanto i linfonodi «risparmiati» sono quelli che vengono attivati da IL2 (con meccanismi a cascata nel tempo) e producono quelli T linfociti citotossici specifici per gli antigeni tumorali, che dovrebbero funzionare da «spazzini» della mrd.

Si può quindi concludere come un'attenta raccolta, e conseguente valutazione, di fattori prognostici clinici e patologici (consolidati dalla sperimentazione) è momento cruciale per decidere il tipo di trattamento di prima scelta, l'integrazione terapeutica e le modalità tecniche e temporali del follow-up.

Se per quanto riguarda i fattori prognostici clinici e anatomo-patologici ci sono moltissime certezze per cui si può affermare che essi sono codificati e possono essere considerati di uso corrente, le cose si complicano per quanto riguarda i fattori prognostici più strettamente biologici, che ci derivano dalla biologia molecolare. La ricerca molecolare si è affermata negli ultimi 15 anni circa, dopo il «boom» dell'immunologia dei tumori, che qualche delusione l'ha creata pur avendo contribuito notevolmente alla conoscenza del sistema immunitario.

Sono stati via, via identificati, prima in campo sperimentale e poi umano, proto-oncogeni che, legandosi a recettori specifici e inducendo la formazione di protei-

ne effettrici, erano in grado di accelerare, in modo disordinato e anarchico, i processi proliferativi, divenendo così causa di carcinogenesi. Nello stesso tempo sono stati identificati geni oncosoppressori che hanno il compito di opporsi all'azione stimolante dei proto-oncogeni: questi ultimi geni sono operativi anche nella realtà normale, in quanto modulano costantemente le «spinte» proliferative di varia natura.

Mutazioni (soprattutto amplificazioni e iperespressioni) dei proto-oncogeni e nel contempo mutazioni dei geni oncosoppressori possono essere causa di carcinogenesi.

Sono state inoltre studiate le molecole di adesione (integrine e ligandi) la cui funzione è quella di regolare gli scambi metabolici tra cellula e cellula e la disposizione spaziale delle stesse, e la cui alterazione (perdita di polarità e disorganizzazione spaziale) è causa di progressione neoplastica e metastatizzazione.

Evidenze interessanti infine derivano dagli studi sulla neoangiogenesi che, in tumori sperimentali, si correla nettamente con la prognosi, mentre mostra comportamenti più incerti in oncologia umana.

La lettura della bibliografia di studi molecolari crea una serie di problemi. Innanzitutto sono moltissimi i lavori fatti su pochi casi e che non hanno trovato una riconferma sperimentale. Come ci sono molti lavori che giungono a conclusioni spesso contrastanti. Tutto ciò è fonte di confusione e crea impossibilità di utilizzare i vari messaggi biologici a uso clinico-pratico. Di qui la necessità di prendere in considerazione soltanto quei lavori con alta significatività statistica in analisi multivariata condotti su di un numero di pazienti maggiore di 100 e che abbiano avuto conferme in altri lavori.

Una volta identificato un fattore prognostico molecolare significativo, il problema è se decidere di indicarlo come fattore prognostico da ricercarsi di routine, tenendo presente che a monte di questi studi ci devono essere le strutture tecnologiche della biologia molecolare, il personale tecnico altamente specializzato; senza contare i costi di gestione del materiale che non sono sicuramente a buon mercato.

Una buona parte degli Ospedali in cui si trattano tumori del distretto cervicofacciale, non posseggono le attrezzature della biologia molecolare, per cui diventa arduo pensare di fare di routine questi test, che oltretutto fanno lievitare i costi di gestione. Si può pensare di indicare l'esecuzione di routine di questi test soltanto in centri che potremmo definire di 2° livello, con laboratori di biologia molecolare finalizzati anche all'assistenza e che possono «coordinarsi» con le Divisioni cliniche e radioterapiche. Questi potrebbero essere ISTITUTI TUMORI O COMPREHENSIVE CANCER CENTERS quale quello, denominato COES-CERMS, situato nella struttura dell'Azienda Università-Ospedale «Molinette» di Torino, oppure strutture universitarie adeguate allo scopo.

In questi centri (finalizzati anche alla ricerca) l'utilizzo di uno staging anche molecolare, permette il progredire della ricerca applicata e di finalizzarla anche al disegno di trials in cui siano implicati prodotti delle biotecnologie.

Si tratta pertanto al momento di un discorso selettivo, per strutture e costi, che però non può essere trascurato poiché è da questo tipo di ricerche biologiche applicate che potrebbero nascere nuove terapie più decisive.

SUMMARY

The increasing knowledge about clinical oncology and biology of head and neck carcinomas, together with the improvement of statistical methods for studying the prognostic role of clinical and biological factors, have outlined several prognostic factors, based on scientific data. These factors can have a routine clinical application in head and neck oncology. Moreover clinical and histo-pathological factors (i.e. age, stage, concomitant diseases, data obtained from pTNM as pN+, capsular breakings, intra-vascular emboli, etc) have been more clearly defined and reinforced.

As a result it has been accepted that the prognostic factors listed above (having been studied in depth) can have an everyday application and they can be put in the case history of these patients.

After a detailed description of what we know at the moment about carcinogenesis and metastatic progression of these tumors, we have considered some biological and molecular factors. The purpose is to make the surgeon acquainted with these new cultural world represented by the molecular biology connected with oncogenesis and metastasis in order to highlight that, in the future, the clinician might have to face the evidence resulting from molecular studies and experiment their clinical applications.

We have described several genes that regulate growth factors, cell-cycle, and several tumor suppressor genes and we have considered their possible clinical applications. Moreover we have described and analysed also those factors that regulate cancer progression (adhesion molecules, angiogenesis factors, proteinases, etc).

Then we have accurately evaluated how the different prognostic factors can influence the choice of the therapeutic treatment.

In particular we have reported how some prognostic factors could influence the choice in favour of a conservative surgery instead of a prophylactic dissection in clinically N0 patients.

Besides, we have described some biological factors that can give indications about the sensibility of the tumor to the radiotherapy rather than radio-chemotherapy.

In the end, in a proper chapter, we went into the problem of the structures and the equipment (with the relative cost) that are necessary for the application of the studies about some biological factors in the everyday clinical practice.



GioFil

IL PORTALE DELL'INFORMAZIONE SANITARIA FARMACEUTICA

[Chi è GioFil](#)

[Iscrizione](#)

[Email](#)

[Archivi](#)

Banca Dati Sanitaria Farmaceutica

- [MEDICI e VETERINARI](#)
- [FARMACISTI](#)
- [CLIENTI](#)
- [ACCESSO LIBERO](#)



GioFil.TV e TG Sanità

- [PRESENTAZIONE](#)
- [ACCESSO TG SANITÀ](#)
- [ACCESSO GioFil TV](#)



ECM-Formazione a distanza

- [PRESENTAZIONE](#)
- [ACCESSO DIRETTO](#)



GioFil-Altri progetti

- [Engine](#)
- [Accessi privilegiati](#)
- [GioFil Off-Line](#)

