



Università degli Studi di Padova

DIPARTIMENTO DI MEDICINA
Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

Carcinoma laringeo: tumor-stroma ratio, neoangiogenesi e loro valore prognostico

Studio pilota su biopsie preoperatorie e corrispondente materiale operatorio

Laureanda:
Francesca Agugiaro
1144614

Relatore:
Prof. Gino Marioni
Correlatrice:
Dott.ssa Lara Alessandrini

Indice

1	Introduzione	9
1.1	Anatomia della laringe	9
1.2	Funzioni della laringe	16
2	Neoplasie laringee	19
2.1	Presentazione clinica del tumore laringeo	19
2.2	Epidemiologia ed eziopatogenesi	20
2.3	Istotipi	25
2.4	Esami diagnostici	26
2.5	TNM staging 8 ^a edizione	28
2.6	Linee guida di trattamento	31
3	Stroma tumorale, angiogenesi e targeted therapy	37
3.1	Limiti del TNM staging	37
3.2	Componenti del microambiente tumorale	38
3.3	TSR come fattore prognostico nei tumori solidi e in precedenti studi su LSCC	41
3.4	Neoangiogenesi: importanza per la crescita e la progressione del tumore	43
3.5	CD31 Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)	47
3.6	Endogлина (CD105)	48
3.7	MDV e importanza come fattore prognostico in altri tumori e in studi precedenti su LSCC	52
3.8	Targeted therapy contro CD105	54

4	Scopo dello studio	57
5	Materiali e metodi	61
5.1	Popolazione in studio	61
5.2	Valutazione istopatologica di TSR	63
5.3	Analisi immunoistochimica di MVD: CD31- e CD105-assessed MVD	64
5.4	Analisi statistica	65
6	Risultati	69
7	Discussione	81
8	Conclusioni	85
	Bibliografia	87

Riassunto

Obiettivi

L'interazione fra cellule tumorali e lo stroma è critica nella tumorigenesi, nella neoangiogenesi tumorale e nella progressione tumorale. Gli obiettivi dello studio sono di: (i) indagare la correlazione fra tumor-stroma ratio (TSR) e densità microvascolare (MVD) nelle biopsie preoperatorie e nei corrispondenti materiali operatori in campioni prelevati da carcinomi squamocellulari laringei (LSCC); (ii) valutare l'associazione fra TSR e neoangiogenesi (CD105- and CD31-assessed MVD); (iii) stabilire il valore prognostico di TSR e MVD nelle biopsie preoperatorie e nei corrispondenti materiali operatori.

Metodi

TSR, CD105- e CD31-assessed MVD sono stati valutati nelle biopsie preoperatorie e nei corrispondenti materiali operatori provenienti da 43 casi consecutivi di LSCC.

Risultati

TSR mostra una buona concordanza fra le biopsie preoperatorie e i corrispondenti materiali operatori (AC1 statistic: 0.7957). Nelle biopsie, i casi TSR low/stroma rich sono associati a una maggiore CD105-assessed MVD ($p=0.0380$). Nei materiali operatori la mediana di CD105- e CD31-assessed MVD era significativamente più elevata nei pazienti TSR low/stroma rich rispetto ai TSR high/stroma poor ($p=0.0089$ e $p=0.0391$). Nel modello di analisi univariata di Cox, TSR predice la disease-free survival (DFS) sia nelle biopsie che nei materiali operatori corri-

spondenti ($p=0.0003$ and $p=0.0002$). DFS è associata a CD105- e CD31-assessed MVD sia nelle biopsie ($p<0.0001$ per entrambe) che nei materiali operatori corrispondenti ($p<0.0001$ per entrambe). Considerando le biopsie, l'analisi multivariata ha trovato che sia TSR ($p=0.0032$; HR=6.112, 95%CI: 1.833–20.378), che la CD105-assessed MVD ($p=0.0002$; HR=1.201, 95%CI: 1.090–1.322), sono predittori di DFS. Nei corrispondenti materiali operatori, sia TSR ($p=0.0074$; HR=6.137, 95%CI: 1.626–23.172), che la CD105-assessed MVD ($p=0.0005$; HR=1.172 95%CI 1.071–1.282), hanno mantenuto la loro significatività all'analisi multivariata.

Conclusioni

Se confermato da studi prospettici più ampi, TSR e MDV potrebbero essere proposti come biomarcatori prognostici nel LSCC per una possibile intensificazione della terapia o per la targeted therapy.

Abstract

Objectives

The interaction between tumor cells and stroma is critical in tumorigenesis, tumor neo-angiogenesis and cancer progression. The aims of this study were to: (i) evaluate the concordance between tumor-stroma ratio (TSR) and microvascular density (MVD) on paired biopsy and surgical specimens of laryngeal carcinoma (LSCC); (ii) investigate the association of TSR with angiogenesis (CD105- and CD31-assessed MVD); (iii) assess the prognostic role of TSR and MVD evaluated on preoperative biopsies and paired surgical specimens.

Methods

TSR, CD105- and CD31-assessed MVD were analysed in paired biopsies and surgical specimens of 43 consecutive cases.

Results

TSR showed good agreement between biopsies and surgical specimens (AC1 statistic: 0.7957). In biopsies, TSR low/stroma-rich cases showed higher CD105-assessed MVD ($p=0.0380$). In surgical specimens both median CD105- and CD31-assessed MVD were significantly higher in TSR low/stroma-rich than in TSR high/stroma-poor patients ($p=0.0089$ and $p=0.0391$). In the univariate Cox's model, TSR predicted disease-free survival (DFS) in both biopsies and surgical specimens ($p=0.0003$ and $p=0.0002$). DFS was associated with CD105- and CD31-assessed MVD in biopsies ($p<0.0001$ for both) and surgical specimens ($p<0.0001$ for both). Considering biopsies, the multivariate analysis found both TSR ($p=0.0032$; HR=6.112,

95%CI: 1.833–20.378) and CD105-assessed MVD ($p=0.0002$; HR=1.201, 95%CI: 1.090–1.322) as DFS predictor. In paired surgical specimens, both TSR ($p=0.0074$; HR=6.137, 95%CI: 1.626–23.172) and CD105-assessed MVD ($p=0.0005$; HR=1.172, 95%CI 1.071–1.282) retained their significance in multivariate analysis.

Conclusions

If confirmed by large prospective studies, TSR and MVD could be proposed as prognostic biomarkers of LSCC for a possible treatment intensification or targeted therapy.

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Anatomia della laringe

La laringe è una struttura anatomica complessa sia dal punto di vista morfologico che funzionale. La cavità laringea è una struttura impari e mediana che si estende dall'epiglottide al margine inferiore della cartilagine cricoidea [1]. È posizionata anteriormente nella loggia dei visceri del collo al di sotto dell'osso ioide, in continuazione superiormente con l'orofaringe, lateralmente e posteriormente con l'ipofaringe ed inferiormente con la trachea. Ha la forma di una piramide triangolare con la base in alto e l'apice tronco che è in continuità con la trachea [2]. I suoi mezzi di fissità sono rappresentati dalla continuità con trachea e faringe e dai muscoli e legamenti che la connettono superiormente all'osso ioide e inferiormente al torace [2]. Nell'adulto cranialmente il margine superiore della cartilagine tiroidea corrisponde a C4, caudalmente il margine inferiore della cartilagine cricoidea corrisponde a C6 [3]. Nel bambino ha una posizione più alta (da C3 a C4), nelle donne ha una posizione leggermente più craniale rispetto agli uomini, negli anziani tende a posizionarsi più caudalmente [3]. I movimenti del collo ne modificano la posizione, viene elevata dai movimenti di estensione e spostata in basso dai movimenti di flessione, inoltre si muove durante la deglutizione e la fonazione, e può essere mobilizzata lateralmente con la palpazione. Nei pressi dei margini posteriori della laringe decorrono l'arteria carotide comune, la vena giugulare interna e il nervo

vago [1].

La laringe ha un'impalcatura cartilaginea che supporta strutture muscolari, nervose, vascolari, legamentose e fibrose [1]. Partecipa alla costituzione delle vie aeree superiori ed è ricoperta di epitelio respiratorio ciliato pseudostratificato, tranne sulle corde vocali vere, che sono ricoperte di epitelio pavimentoso pluristratificato non cheratinizzato (adatto a rispondere alle sollecitazioni meccaniche a cui le corde vocali sono sottoposte) [1][2]. Sono presenti rare ghiandole salivari minori [1][2].

Anatomia topografica della laringe

La laringe può essere suddivisa in tre porzioni, procedendo cranio-caudalmente: sovraglottide, glottide e sottoglottide [1].

La sovraglottide è quella porzione che va dall'adito laringeo (apertura ovoidale fra la faringe e la laringe, è posto su un piano fortemente inclinato dall'alto in basso e dall'avanti in dietro) alla glottide [1]. Comprende i ventricoli laringei (spazio fra la corda vocale vera e quella falsa), le corde vocali false, la superficie posteriore dell'epiglottide, le cartilagini aritenoidi e la porzione mediale delle pieghe ariepiglottiche. Le corde vocali false sono formate da un ispessimento del margine inferiore della membrana quadrangolare, e sono ricoperte di mucosa respiratoria [1][2].

La glottide è costituita dalle corde vocali vere, dalle commissure anteriore e posteriore e dalla fessura fra le corde vocali anteriormente e le cartilagini aritenoidi posteriormente. Questa fessura ha forma triangolare durante la respirazione a riposo, si allarga a pentagono durante la respirazione profonda grazie alla contrazione dei muscoli cricoaritenoidi posteriori e cricotiroidei, si restringe durante la fonazione, la deglutizione e la manovra di Valsalva [1][2]. Il diametro sagittale della glottide è circa 23 mm nell'uomo adulto e 17 mm nella donna, è il punto più stretto della laringe e delle vie aeree superiori [1].

La sottoglottide, o ipoglottide, si estende da 1 cm al di sotto del margine libero delle corde vocali vere fino al margine inferiore della cartilagine cricoide [1][2].

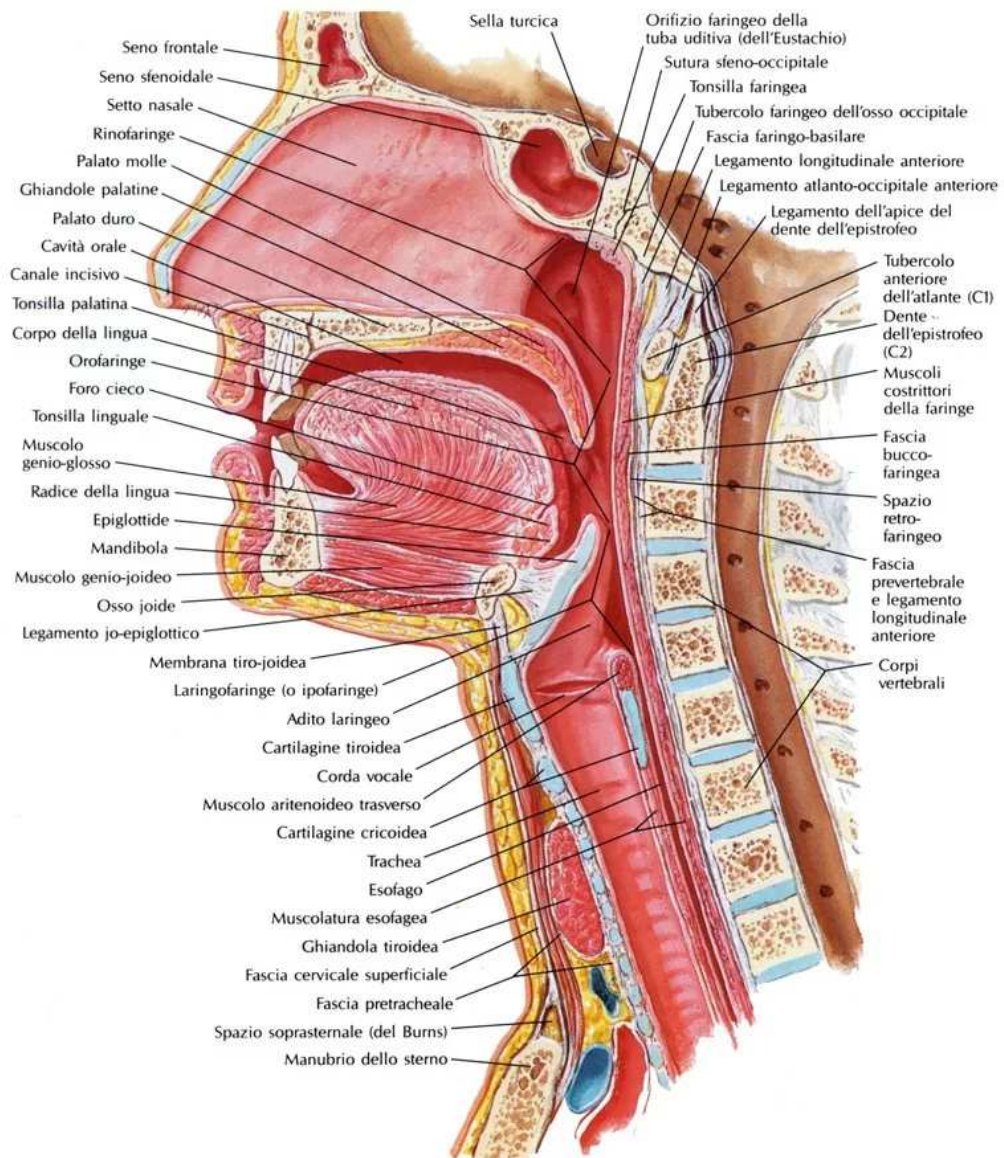


Figura 1.1: Panoramica di testa e collo in sezione sagittale mediana [4].

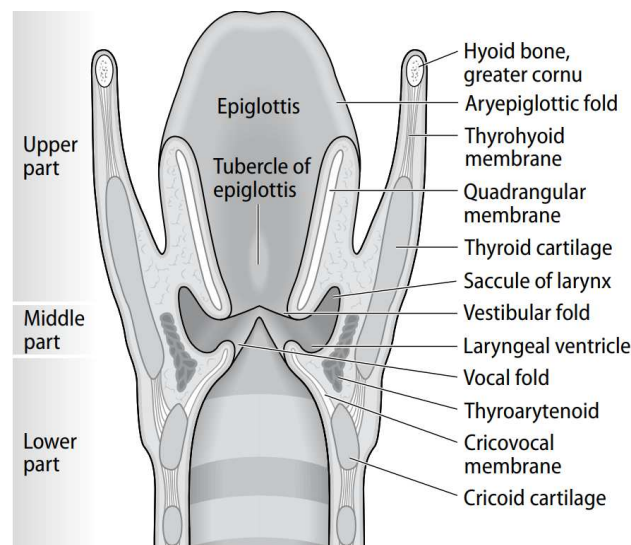


Figura 1.2: Sovraglottide, glottide e sottoglottide [1].

Scheletro cartilagineo della laringe

Lo scheletro cartilagineo della laringe è costituito da cartilagini impari (cartilagine tiroidea, epiglottide e cartilagine cricoidea) e cartilagini pari (le cartilagini aritenoidi e corniculate) [1].

La laringe è collegata dal margine superiore della cartilagine tiroidea al margine inferiore dell'osso ioide tramite la membrana e i legamenti tiroioidi [2].

L'epiglottide è una cartilagine fibroelastica posizionata posteriormente alla base della lingua, è collegata anteriormente all'osso ioide tramite il legamento ioepiglottico. Inferiormente, tramite il legamento tiroepiglottico, si collega alla faccia posteriore della cartilagine tiroide appena al di sopra delle corde vocali vere, e lateralmente si collega alle cartilagini aritenoidi tramite le pieghe ariepiglottiche, che contengono i muscoli ariepiglottici [1][2]. Nella porzione antero-inferiore è rivestita di tessuto adiposo che va a formare lo spazio tiroioepiglottico, limitato anteriormente dalla membrana tiroioidea [3][5].

La cartilagine cricoide è inferiormente collegata alla trachea dalla membrana cricotracheale, e si articola con la cartilagine tiroidea e le due cartilagini aritenoidi tramite articolazioni sinoviali diartrodie, dotate di capsula [2]. La cartilagine cricoide è l'unica in tutto il tratto respiratorio a forma di anello completo. La membrana cricotiroidea rappresenta la porzione più superficiale delle vie aeree a livello del col-

lo, ed è il punto di accesso alle vie aeree più facile da individuare in situazioni di emergenza [1].

Le cartilagini tiroidea, cricoidea e aritenoidi sono ialine e possono calcificare nel corso della vita (solitamente questo processo nelle donne ha inizio più tardi che negli uomini), mentre i processi vocali delle aritenoidi e l'epiglottide sono formati da cartilagine fibroelastica e non ossificano mai [1][2].

Muscolatura della laringe

La muscolatura laringea è complessa, tutti i muscoli sono striati volontari e, tranne il muscolo cricotiroideo (che è innervato dal nervo laringeo superiore, un nervo motorio e sensitivo), sono innervati dal nervo laringeo inferiore (o ricorrente, nervo esclusivamente motorio) [2]. Vengono distinti in intrinseci, se hanno entrambe le inserzioni sulle parti cartilaginee della laringe, ed estrinseci, se hanno uno dei capi di inserzione su parti ossee o su organi adiacenti e l'altro sulle cartilagini laringee [2].

I muscoli intrinseci sono i muscoli: cricotiroidei, cricoaritenoidi posteriori e laterali, tiroaritenoidi, aritenoidi trasversi ed obliqui, ariepiglottico. I muscoli intrinseci possono allargare o restringere la rima della glottide, permettendo rispettivamente la respirazione e la fonazione [1][2].

I muscoli estrinseci sono i muscoli: sternotiroideo, tiroioideo, stilofaringeo, faringopalatino, costrittore inferiore della faringe [1][2].

Spazi laringei, vascolarizzazione e drenaggio linfatico

Nella porzione antero-inferiore dell'epiglottide e anteriormente alla sovraglottide è presente lo spazio preepiglottico, o spazio tiroioepiglottico, uno spazio contenente tessuto adiposo e ricco di strutture linfatiche che contribuiscono alla diffusione metastatica precoce alle catene linfonodali del collo [1]. È limitato anteriormente dalla membrana tiroioidea, superiormente dal legamento ioepiglottico, inferiormente dalla cartilagine tiroidea, postero-inferiormente dall'epiglottide e dal legamento tiroepiglottico [3][5].

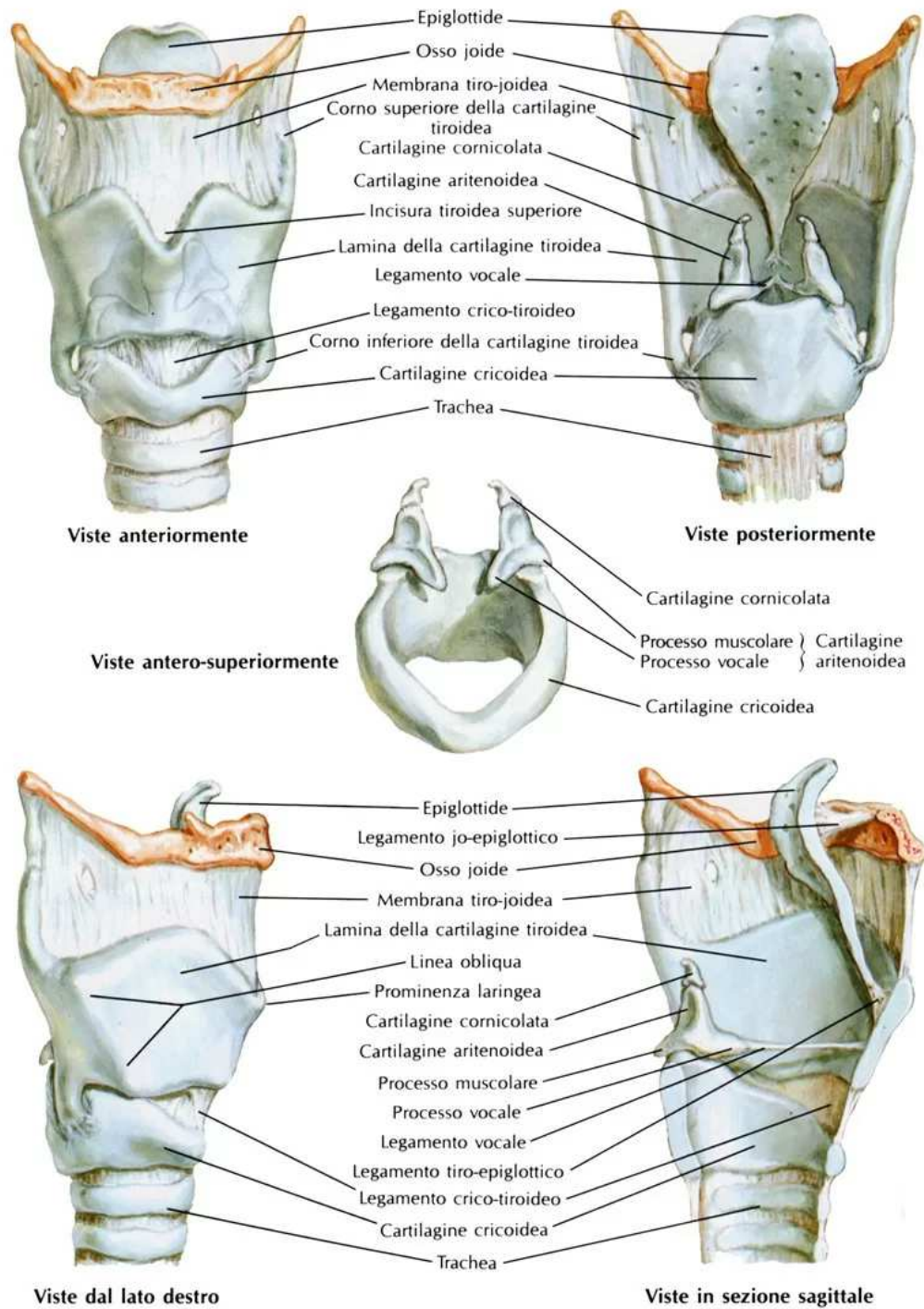


Figura 1.3: Cartilagini della laringe, varie proiezioni [4].

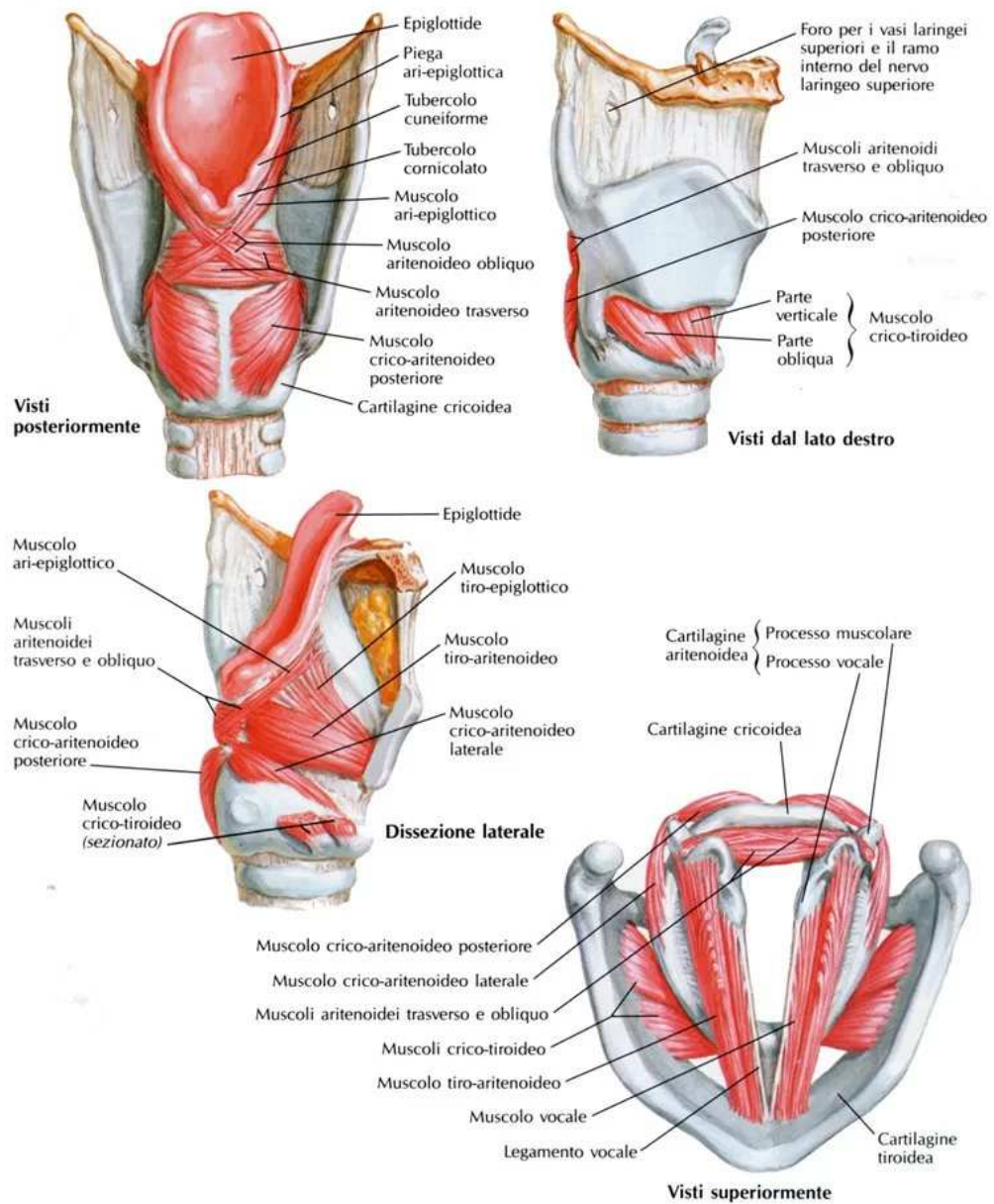


Figura 1.4: Muscolatura intrinseca della laringe, varie proiezioni [4].

Lo spazio preepiglottico è postero-lateralmente in continuità con lo spazio paraglottico, il quale è uno spazio contenente tessuto adiposo posto fra le ali della cartilagine tiroidea e i muscoli vocali del piano glottico, e la membrana quadrangolare a livello delle corde vocali false [3][5]. Questo spazio può diventare una via per l'espansione sottomucosa di una neoplasia dalla glottide verso la sovraglottide e/o la sottoglottide, e viceversa; il tumore così esteso a tutta la laringe si dice transglottico [3][5].

La lamina propria della laringe è sottile e contiene linfociti che, nella parte superiore del ventricolo laringeo, sono organizzati in noduli che nel loro insieme formano la tonsilla laringea [2].

La laringe è vascolarizzata dall'arteria laringea superiore (che irrorla mucosa e muscoli del piano superiore della laringe), dall'arteria laringea media (irrorla mucosa e piano inferiore della laringe) e dall'arteria laringea inferiore (muscoli e mucosa posteriore della laringe) [3]. Le vene laringee superiori, attraverso le vene tiroidee superiori, fanno a capo alla vena giugulare interna, mentre le vene laringee inferiori, attraverso le vene tiroidee inferiori, fanno a capo alla vena anonima a sinistra e brachiocefalica a destra [1][2].

I vasi linfatici (Figura 1.5a) sono molto numerosi e possono essere divisi in due gruppi:

- Quelli della parte sovraglottica, che fanno capo ai linfonodi giugulari interni (Figura 1.5b) [1];
- Quelli della parte sottoglottica, che fanno capo ai linfonodi giugulari, con l'intermezzo dei linfonodi prelaringei e pretracheali, e in quelli sopraclaveari e sottosternocleidomastoidei (Figura 1.5b) [1].

1.2 Funzioni della laringe

Respirazione, clearance delle secrezioni, protezione delle vie aeree

La laringe partecipa alla respirazione, al meccanismo di clearance delle secrezioni e alla protezione delle vie aeree impedendo la penetrazione del bolo alimentare

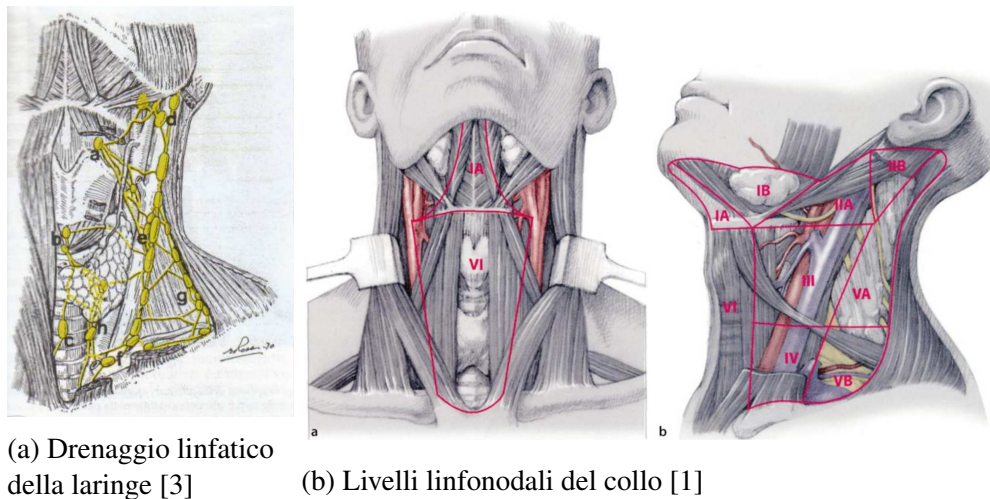


Figura 1.5: Sistema linfatico del collo

e di secrezioni all'interno delle vie aeree [6]. Questo meccanismo involontario di protezione è molto importante perché laringe ed ipofaringe sono in comunicazione, e se viene meno si possono verificare soffocamento (in casi estremi) e polmoniti ab ingestis [1].

I meccanismi riflessi laringei sono mediati dalla sensibilità mucosale e dai recettori articolari che viaggiano lungo i nervi laringei superiori e i nervi laringei ricorrenti. I riflessi laringei più importanti sono il laringospasmo, il riflesso della tosse e di apnea [2]. La protezione si esplica durante la deglutizione in maniera coordinata e contemporanea tramite occlusione delle vie aeree da parte dell'epiglottide (insieme alla retropulsione della base della lingua e l'elevazione laringo-faringea) e con il riflesso di chiusura glottica. In realtà l'epiglottide non è fondamentale per la deglutizione, che può avvenire lo stesso con rischio di aspirazione minima anche quando l'epiglottide è rimossa chirurgicamente nell'escissione dei tumori sovraglottici [1][2].

La fonazione e la fissazione

Un'altra importante funzione della laringe è la fonazione: la laringe presenta una parte vibrante in corrispondenza del restringimento a livello glottico dove ci sono le corde vocali per cui, grazie alla pressione esercitata dall'aria in uscita dai polmoni, la rima glottica vibra [2]. Le caratteristiche delle corde vocali (lunghez-

za, tensione, spessore) determinano in grande parte il timbro della voce, che per il resto è determinato dalla regione sovraglottica, dalle strutture faringee e delle cavità nasali, tutte strutture che a loro volta sono soggette alla vibrazione provocata dal passaggio dell'aria. L'atto della fonazione richiede un adeguato controllo della muscolatura laringea ai fini di controllare la chiusura della glottide, la tensione e lunghezza adeguata delle corde vocali, oltre al mantenimento di una consistenza e compliance adatta dei tessuti delle corde vocali [1][2].

La laringe consente di mantenere pressioni differenti a livello del collo, del torace e dell'addome, permettendo l'esecuzione della manovra di Valsalva, per la quale è necessaria una chiusura efficace della glottide. Questa funzione di fissazione è essenziale per gli atti fisiologici come la defecazione, la minzione, la tosse, le spinte del parto, per sollevare pesi. La fissazione della parete toracica offre un solido sostegno ai muscoli del tronco e del cingolo scapolare, consentendo di compiere sforzi intensi. Per sviluppare una pressione sottoglottica sufficiente è necessario un supporto respiratorio adeguato [1][2].

Capitolo 2

Neoplasie laringee

2.1 Presentazione clinica del tumore laringeo

La sintomatologia varia in base alla localizzazione della neoplasia in relazione alle tre regioni anatomiche descritte precedentemente e in base all'estensione della neoplasia [7].

Le neoplasie glottiche danno sintomi precoci, fra cui la disfonia, difatti anche una lesione di dimensioni modeste può comportare un'alterazione del tono vocale che viene percepita dal paziente [6]. È importante non sottovalutare una disfonia che perdura per più di due settimane in un soggetto che presenta fattori di rischio, in quanto è un segnale d'allarme che può permettere di fare diagnosi precoce [8]. Altri sintomi sono tosse e dispnea; la laringe glottica è la parte delle vie aeree superiori con diametro minore e anche neoplasie di piccole dimensioni causano ostruzione al flusso d'aria [1].

Le neoplasie sovraglottiche e di confine tendono a dare una sintomatologia più tardiva, i sintomi più frequentemente riferiti sono la disfagia (dovuta sia all'ingombro del tumore, sia all'alterazione dei meccanismi di protezione mediati dalla laringe stessa) e l'odinofagia. L'emoftoe e l'otalgia riflessa ipsilaterale sono sintomi molto tardivi [1].

I casi di neoplasia strettamente sottoglottica sono infrequenti e danno sintomi quando la neoplasia è in stadi avanzati. Il sintomo più comune è la dispnea. È

più frequente che il tumore origini dalla glottide o dalla sovraglottide e si diffonda caudalmente fino alla sottoglottide dando un coinvolgimento transglottico [8].

Il carcinoma laringeo tende a metastatizzare ai linfonodi del collo. I tumori strettamente glottici, avendo le corde vocali una rete linfatica meno sviluppata, tendono a dare meno frequentemente metastasi e queste solitamente sono ipsilaterali. I tumori mediani danno più spesso metastasi bilaterali, rispetto ai tumori con sede più lateralizzata [9]. In alcuni casi il primo sintomo della neoplasia è proprio la presenza di uno o più linfonodi ingrossati, che posso essere visibili all'ispezione e/o palpabili [1]. Se sono molto voluminosi possono dare compressione delle strutture adiacenti. Lo status linfonodale è il determinante principale dell'outcome nel carcinoma laringeo a cellule squamose (LSCC) [10].

Le metastasi a distanza sono infrequenti al momento della diagnosi, ed impattano gravemente sulla prognosi, molto più che le metastasi linfonodali. Le sedi colpite più di frequente sono il polmone, il fegato, le ossa e la cute, mentre altre sedi di metastasi sono più rare [9].

2.2 Epidemiologia ed eziopatogenesi

La situazione epidemiologica mondiale del tumore alla laringe dal 1990 al 2017 è riassunta nella Figura (2.1). Nel 2017 in tutto il mondo sono stati diagnosticati 2.76 nuovi casi per 100.000 abitanti, in tutto 210.606 nuovi casi. La prevalenza nello stesso anno era di 1.09 milioni di casi (14.33 casi per 100.000 abitanti), le morti per carcinoma alla laringe sono state 126.471 (1.66 per 100.000 abitanti), i DALYs, disability-adjusted life year, sono stati 3.28 milioni (cioè circa lo 0.13% dei DALYs totali) [11]. I DALYs associati alle neoplasie laringee hanno un picco in entrambi i sessi intorno ai 60-75 anni (circa 350:100.000 nell'uomo e 56:100.000 nella donna) e si riducono per le età successive.

Per quanto riguarda la distribuzione per età, c'è un incremento costante di tutte le misure epidemiologiche in entrambi i sessi dopo i 35 anni. L'incidenza e la prevalenza di questa neoplasia sono aumentate nelle ultime decadi, la mortalità è diminuita solo del 5% (Figura 2.1) [11].

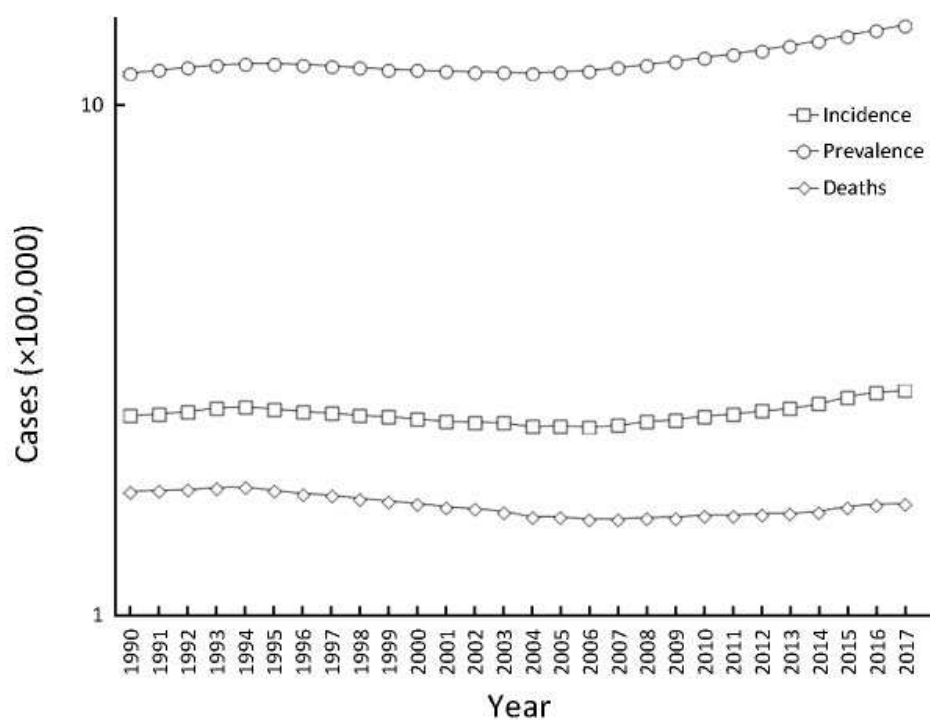


Figura 2.1: Grafico di incidenza, prevalenza e numero di decessi [11].

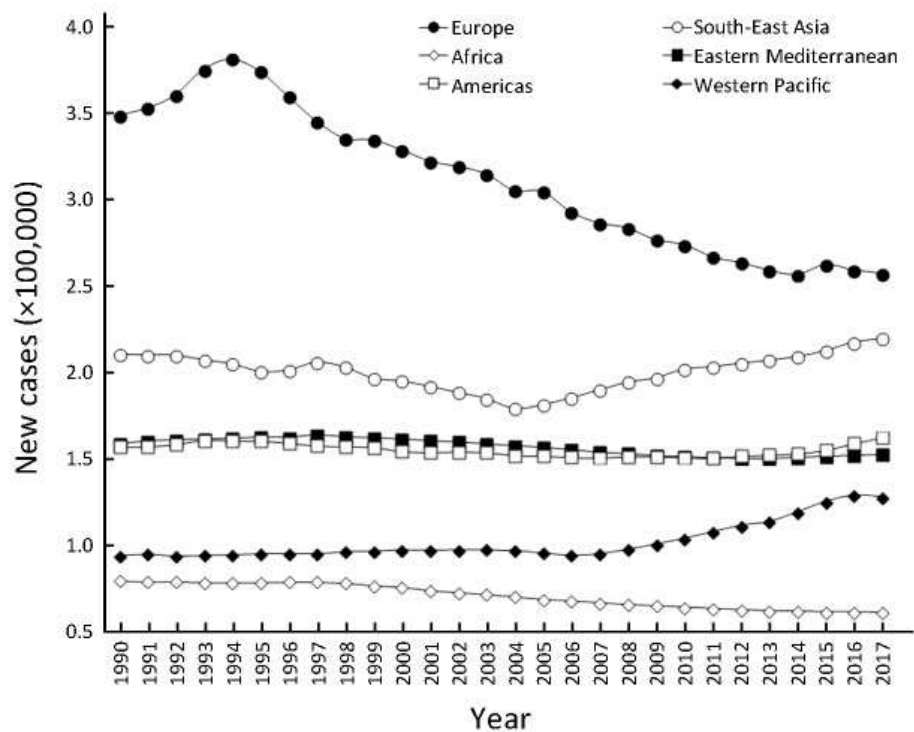


Figura 2.2: Incidenza nelle macroaree [11].

Fra tutte le neoplasie maligne umane, quelle laringee si trovano al 22esimo posto in termini di incidenza (0.89% di tutte le neoplasie maligne), al diciottesimo posto per la prevalenza (1.44%) e per la mortalità (1.39% di tutte le morti dovute a tumori) [11].

In Europa la sopravvivenza a 5 anni per i carcinomi squamocellulari della laringe è del 61% (49% per gli SCC della cavità orale, 41% per SCC orofaringei, 25% per SCC ipofaringei) [7].

I vari parametri epidemiologici sono diversi nelle varie aree geografiche, in particolare la Figura (2.2) riporta l'incidenza nelle macroaree fra il 1990 e il 2017 [11].

Epidemiologia dei tumori della laringe in Italia

I tumori maligni del distretto testa-collo rappresentano in Italia circa il 3% delle malignità. Ogni anno si diagnosticano circa 13.000 nuovi casi e la maggior parte di essi si osserva nella popolazione maschile (7.300 casi) [9]. L'incidenza annuale è 18 su 100.000 abitanti, un dato simile a quello riscontrato nell'Unione Europea. La malattia è tre volte più frequente nel nord del paese [8]. L'incidenza aumenta con l'età per tutte le sedi con eccezione della rinofaringe. Circa il 24% dei nuovi casi di tumore della testa e del collo viene diagnosticato in pazienti con età maggiore di 70 anni [9].

In Italia si contano circa 5.000 nuovi casi l'anno di tumore della laringe tra gli uomini e 500 tra le donne. Le più comuni sedi di origine del carcinoma a cellule squamose della laringe sono la corda vocale vera, l'epiglottide e l'area post-cricoidea [8].

Eziopatogenesi e fattori di rischio delle neoplasie laringee

Per le neoplasie della testa e del collo ed in particolare per il tumore laringeo è stata dimostrata una correlazione con determinate abitudini, in particolare con il fumo di sigaretta (correlato a tutte le forme epiteliali di tumori di testa e collo) ed il consumo di alcool (tumori laringei, del cavo orale, oro-ipofaringei) [8]. Proprio per

questo il tumore della laringe è più frequente in Veneto e in Friuli-Venezia Giulia (18 casi l'anno ogni 100.000 abitanti), regioni in cui il consumo di alcol è tradizionalmente elevato, rispetto a Lombardia, Piemonte, Emilia-Romagna e Toscana (10 casi l'anno ogni 100.000 abitanti) e al Meridione (7.3 casi l'anno ogni 100.000 abitanti) [8].

Il 75% delle neoplasie di testa e collo sono causate da fumo ed alcool, il cui effetto è sinergico: il rischio di sviluppare una neoplasia laringea in chi beve e fuma è 12 volte più elevato rispetto a chi non beve e non fuma (addirittura il rischio risulta superiore di 80 volte per quel che concerne il carcinoma del cavo orale) [9]. L'alcool agisce da solvente facilitando la penetrazione dei carcinogeni nell'epitelio [1].

Il rischio correla anche al numero di sigarette fumate, ed è doppio per chi fuma più di 20 sigarette al giorno rispetto a chi ne fuma meno di venti. Il tabacco nero rispetto al tabacco biondo raddoppia il rischio a parità di esposizione in quanto ha una più elevata concentrazione di sostanze cancerogene (N-nitrosammine, 2-naftilammine) [9]. Il rischio di cancro si riduce dopo la cessazione dell'abitudine al fumo, avvicinandosi nell'arco di 15 anni a quello dei non fumatori [9].

Il fumo nei non bevitori è associato soprattutto allo sviluppo di neoplasie laringee, e solo il 7% circa dei carcinomi laringei sono attribuibili all'alcool in pazienti mai esposti al fumo di tabacco [9]. Altri fattori di rischio per lo sviluppo di carcinomi laringei sono:

- esposizione a sostanze carcinogene e inquinanti ambientali;
- infezione da HPV (in Italia si stima che meno del 2.5% dei carcinomi laringei sia dovuto ad infezione da HPV, mentre ha una rilevanza molto maggiore nel carcinoma faringeo);
- il sovrappeso e l'obesità;
- stati di immuno-compromissione;
- l'età avanzata;
- pregressi trattamenti radioterapici sul distretto testa-collo e radiazioni ionizzanti;

- il reflusso gastro-esofageo [1][8][9].

Per quanto riguarda la localizzazione delle neoplasie laringee la maggior parte, circa 2/3, origina dalla regione glottica, il 30% circa dalla regione sovraglottica, mentre le neoplasie transglottiche e quelle subglottiche sono meno frequenti [1][8].

Cancerizzazione di campo

Il concetto di cancerizzazione di campo (Field cancerization) fa riferimento al progressivo accumulo di alterazioni genetiche in un tessuto esposto a sostanze cancerogene, che rappresenta la base della progressione/trasformazione da cellula normale a cellula neoplastica [1][9]. Probabilmente una delle più precoci alterazioni geniche del processo di carcinogenesi è la perdita di materiale cromosomiale, che a sua volta predispone ad ulteriori alterazioni.

Nei tumori epiteliali tali alterazioni avvengono primariamente nelle cellule staminali dello strato basale dell'epitelio. L'epitelio adiacente alla sede del tumore appare macroscopicamente sano, ma sono talvolta presenti unità clonali contenenti alterazioni oncogeniche. Questo tessuto apparentemente sano attorno al tumore è definito "campo a rischio" [9].

È probabile che queste alterazioni iniziali clonali siano all'origine dello sviluppo di nuovi carcinomi nelle porzioni adiacenti al tumore già trattato. Normalmente invisibili alla semplice ispezione clinica, questi campi a rischio possono talvolta assumere l'aspetto di lesioni leucoplasiche [1]. Un dato di rilievo è che queste lesioni iniziali tendono a trasformarsi in carcinoma in un costante rapporto del 2–3% per anno. L'implicazione clinica della presenza dei campi a rischio attorno al tumore target è rilevante (pazienti trattati per carcinoma del cavo orale ed orofaringe sviluppano tumori metacroni o sincroni in percentuali variabili comprese tra 17 e 30%) [9].

Nel caso dei tumori metacroni è di particolare importanza clinica/prognostica definire se trattasi di recidiva locale di malattia, oppure di insorgenza di un secondo tumore primitivo [7]. La definizione di queste due entità sul piano clinico non è completamente condivisa, tuttavia, uno dei criteri proposti prende in considerazione

schematicamente la distanza della nuova neoplasia in termini spaziali e temporali dalla neoplasia target [9]:

- recidiva locale: esame istologico precedente non radicale e/o tumore insorto a <2cm e <3 anni dal trattamento precedente. L'analisi comparativa dei pattern molecolari permetterebbe di superare questa distinzione meramente clinica e nella recidiva locale le aberrazioni molecolari sono simili al tumore primitivo [9];
- secondo tumore primitivo: esame istologico precedente radicale, distanza >2cm e insorto dopo tre anni dal trattamento precedente; inoltre i marcatori molecolari sono in parte simili ed in parte differenti [9].

2.3 Istotipi

Tumori laringei benigni

I tumori benigni laringei non sono comuni, la diagnosi deve essere accurata e deve comprendere un'appropriata indagine endoscopica e una biopsia per escludere che non siano maligni. Il management di queste neoplasie è mirato a preservare la funzionalità della laringe e spesso un'escissione endoscopica con il laser è sufficiente, anche se le recidive sono una possibilità [1].

Tumori laringei maligni

Per quanto riguarda i tumori maligni, la complessità degli istotipi è direttamente proporzionale alla varietà dei tessuti presenti a livello laringeo. Dal punto di vista della numerosità, in questo distretto così come nel resto nelle vie aero-digestive superiori prevalgono i tumori epiteliali [1]. Il 90-95% nelle neoplasie maligne laringee sono carcinomi squamosi, che colpiscono l'epitelio di rivestimento della laringe [12].

Esistono numerosi sottotipi istologici delle neoplasie originarie dall'epitelio di rivestimento, che presentano caratteristiche differenti sia dal punto di vista anatomicopatologico che del comportamento oncologico [1].

Il carcinoma verrucoso è estremamente differenziato, si localizza prevalentemente nella regione glottica e tende a crescere lentamente a livello locale, inoltre tende a dare molto infrequentemente metastasi ai linfonodi regionali [1].

Il carcinoma a cellule fusate è l'esatto opposto: morfologicamente è molto simile alle neoplasie sarcomatose, spesso la differenziazione è molto ridotta. Tende a diffondersi a livello regionale e viene spesso diagnosticato quando ha già localizzazione transglottica [12].

I tumori linfatici sono molto infrequenti e sono prevalentemente linfomi non-Hodgkin [12].

I tumori dei tessuti molli costituiscono il 2-3% delle neoplasie alla laringe [12]. I tumori laringei dei tessuti molli tendono a non dare metastasi linfonodale laterocervicale. La distinzione tra forma epiteliale o mesenchimale, quindi, non è solo accademica, bensì è fondamentale per comprendere il comportamento biologico del tumore con importanti ripercussioni dal punto di vista clinico e terapeutico: permette infatti di escludere dal piano terapeutico di trattamento lo svuotamento laterocervicale elettivo [1].

I tumori secondari a livello laringeo sono rari, sono espressione di una disseminazione sistemica del tumore primitivo molto avanzata. La prognosi è estremamente infausta, per cui l'unico approccio possibile è quello chirurgico palliativo al fine di permettere la respirazione [1].

2.4 Esami diagnostici

Le indagini diagnostiche per la ricerca di eventuali neoplasie laringee solitamente hanno inizio nel momento in cui il paziente si presenta lamentando uno o più dei sintomi descritti in precedenza (vedi sezione 2.1) [1].

La valutazione clinica deve comprendere: anamnesi e storia dettagliata della sintomatologia, esame obiettivo completo, valutazione del performance status (PS) del paziente, valutazione dello status nutrizionale, esami ematochimici completi [7].

Nell'anamnesi risulta utile andare a indagare i principali fattori di rischio (fumo attivo e passivo, abuso di alcool), eventuali neoplasie precedentemente diagnosticate

nel distretto della testa e del collo e in generale nel tratto aero-digestivo superiore, anche benigne (ad esempio lesioni leucoplasiche) [9].

L'esame obiettivo deve includere l'ispezione con luce frontale, abbassalingua e specchietti, la palpazione del collo, anche se un esame obiettivo negativo non esclude la presenza di metastasi linfonodali. È necessaria l'esecuzione di una fibroendoscopia flessibile con prelievo di campioni biotici se si riscontrano lesioni all'endoscopia [7]. Va eseguita un'indagine endoscopica di tutto il distretto testa e collo per escludere la presenza di un secondo tumore primitivo [7].

Gli esami ematochimici dovrebbero comprendere un emocromo, la valutazione degli enzimi epatici e dell'albumina, della creatinina sierica e dell'eGFR, dei parametri della coagulazione e del TSH [7].

La broncoscopia e l'esofagoscopia non vanno eseguite sistematicamente, ma solo se i sintomi e/o altri rilievi diagnostici pongono indicazione alla ricerca di tumori sincroni [7][9].

La diagnostica radiologica deve comprendere necessariamente diverse indagini.

È importante effettuare un'ecografia del collo per valutare lo status linfonodale e per effettuare un'agoaspirato per l'analisi citologica dei linfonodi dall'aspetto ecografico sospetto [7]. L'ecografia del collo è un esame operatore dipendente ed i falsi negativi si attestano intorno al 15%, questo è anche dovuto al fatto che il pattern infiltrativo precoce delle cellule carcinomatose è difficilmente riconoscibile perché non modifica in modo grossolano il linfonodo a livello dell'ilo [1].

Vanno eseguite una tomografia computerizzata con mezzo di contrasto (ceCT) e/o una risonanza magnetica (MRI) con contrasto della testa e del collo. Le due tecniche sono complementari e hanno valore diagnostico simile nella valutazione del tumore primario, del suo grado di infiltrazione e dei linfonodi regionali [7].

Per la valutazione del parametro M (metastasi a distanza) devono essere eseguite una radiografia del torace ed una ecografia dell'addome che indaghi principalmente il fegato [13].

Fra gli esami diagnostici non di routine rientrano alcune tecniche di medicina nucleare, utilizzate per ricercare neoplasie primitive occulte nel caso di pazienti con sintomi suggestivi, negativi all'endoscopia e all'imaging tradizionale, in cui si sia

trovata una massa periferica o linfonodale che dalla biopsia venga identificata come una neoplasia epiteliale di tipo carcinoma squamoso interpretata come metastasi [7]. Per la ricerca di neoplasie occulte, ed eventualmente di secondi tumori primitivi, si può eseguire una 18-FDG-PET total body, o una PET-CT/PET-RMN per avere una migliore risoluzione spaziale [7]. La PET-CT ha un ruolo anche nell'escludere la presenza di malattia residua dopo chemio-radioterapia (valore predittivo negativo del 98% e specificità del 96%) se eseguita almeno dopo 8–12 settimane dalla fine delle cure dato l'elevato rischio di falsi positivi, particolarmente utile anche nei casi dubbi (RM e/o TC) per la discriminazione tra linfonodi patologici omolaterali o controlaterali al tumore primitivo. Per i pazienti in cui la PET-TC dia risultati dubbi sul collo, è suggerita la ripetizione dell'esame dopo 4–6 settimane, in quanto può identificare una quota di pazienti che possono evitare una chirurgia [8][9].

La persistenza di malattia e la recidiva loco-regionale rappresentano nel complesso la modalità più frequente di fallimento terapeutico del carcinoma squamocellulare del testa-collo localmente avanzato. La chirurgia di salvataggio rappresenta l'unica modalità potenzialmente curativa, ma è fattibile solo in un terzo dei casi, è gravata da rilevante morbidità [10] e, nel caso di fattori patologici sfavorevoli, il rischio di ulteriore recidiva supera il 50% [9]. La valutazione della risposta a seguito di un trattamento radio/radiochemioterapico definitivo è pertanto di fondamentale importanza. Il dato metabolico PET-TC deve essere imprescindibilmente associato alla valutazione clinica e ad ulteriori indagini radiologiche di tipo morfologico [9].

2.5 TNM staging 8^a edizione

Secondo l'ottava edizione del TNM staging, la stadiazione della neoplasia laringea viene assegnata valutando i parametri T, N ed M come da descrizione nelle seguenti tabelle [7].

Ad oggi, viene considerata la presenza di estensione extracapsulare (ENE+) solo nel caso in cui la diffusione microscopica abbia una distanza >2mm dalla capsula linfonodale, ovvero nei casi in cui sia evidente la diffusione ai tessuti circostanti [7][8]. Può essere assegnata una diagnosi anche clinica di ENE+ ma solo in

T1	Tumore limitato a un singolo sito della sovraglottide con motilità normale delle corde vocali
T2	Il tumore invade la mucosa di più di un sito adiacente della sovraglottide o glottide o di regioni all'infuori della sovraglottide (quali mucosa della base della lingua, vallecule, parete mediale del seno piriforme) senza fissazione della laringe
T3	Il tumore è limitato alla laringe con fissazione di una corda vocale e/o invasione di uno dei seguenti: area post-cricoidea, spazio preepiglottico, spazio paraglottico e/o faccia interna della cartilagine tiroidea
T4a	Il tumore si estende oltre la cartilagine tiroidea e/o invade tessuti al di fuori della laringe quali: trachea, tessuti molli del collo inclusi muscoli profondi/estrinseci della lingua (genioglosso, ioglosso, palatoglosso e stiloglosso), muscoli anteriori del collo, tiroide, esofago
T4b	Il tumore invade lo spazio prevertebrale, l'arteria carotidea o le strutture mediastiniche

Tabella 2.1: Tumore laringeo sovraglottico (T) [7].

T1	Tumore limitato alla/e corda/e vocale/i (con o senza coinvolgimento della commissura anteriore o posteriore) con motilità conservata T1a: tumore limitato a una corda vocale T1b: tumore coinvolge entrambe le corde vocali
T2	Tumore si estende alla sovraglottide e/o alla sottoglottide e/o con motilità ridotta delle corde vocali
T3	Tumore limitato alla laringe con fissazione delle corde vocali e/o invade lo spazio paraglottico e/o invade la faccia interna della cartilagine tiroidea
T4a	Il tumore si estende oltre la cartilagine tiroidea e/o invade tessuti al di fuori della laringe quali: trachea, tessuti molli del collo inclusi muscoli profondi/estrinseci della lingua (genioglosso, ioglosso, palatoglosso e stiloglosso), muscoli anteriori del collo, tiroide, esofago
T4b	Il tumore invade lo spazio prevertebrale, l'arteria carotidea o le strutture mediastiniche

Tabella 2.2: Tumore laringeo glottico (T) [7].

T1	Tumore limitato alla sottoglottide
T2	Il tumore è esteso alla/e corda/e vocale/i, la motilità delle corde è normale o ridotta
T3	Tumore limitato alla laringe con fissazione delle corde vocali
T4a	Il tumore invade la cartilagine cricoidea o tiroidea e/o invade tessuti al di fuori della laringe quali: trachea, tessuti molli del collo inclusi muscoli profondi/estrinseci della lingua (genioglosso, ioglosso, palatoglosso e stiloglosso), muscoli anteriori del collo, tiroide, esofago
T4b	Il tumore invade lo spazio prevertebrale, l'arteria carotidea o le strutture mediastiniche

Tabella 2.3: Tumore laringeo sottoglottico o ipoglottico (T) [7].

NX	I linfonodi regionali non sono valutabili
N0	Nessuna metastasi nei linfonodi regionali
N1	Metastasi in un singolo linfonodo ipsilaterale in cui la dimensione maggiore è ≤ 3 cm senza estensione extralinfonodale
N2	Metastasi descritta come: N2a: Metastasi in un singolo linfonodo ipsilaterale di dimensione massima compresa fra 3 e 6 cm senza estensione extralinfonodale N2b: Metastasi in multipli linfonodi ipsilaterali, tutti con dimensione massima ≤ 6 cm senza estensione extralinfonodale
N3	N3a Metastasi in un linfonodo di dimensione massima > 6 cm senza estensione extralinfonodale N3b Metastasi in ≥ 1 linfonodo con estensione extralinfonodale

Tabella 2.4: Linfonodi regionali (N). I linfonodi mediali sono considerati ipsilaterali. La presenza di coinvolgimento cutaneo o invasione dei tessuti molli con fissazione profonda o al muscolo sottostante o a strutture adiacenti o con segni clinici di coinvolgimento nervoso è classificato come estensione extranodale [7][8].

M0	Assenza di metastasi a distanza
M1	Presenza di ≥ 1 metastasi a distanza

Tabella 2.5: Metastasi a distanza (M) [7].

0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	
IV A	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	
IV B	T4b	Qualsiasi N	M0
	Qualsiasi T	N3	
IV C	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M1

Tabella 2.6: Staging del tumore [7].

presenza di dati clinici inconfutabili (invasione cutanea, invasione di nervi cranici con disfunzione degli stessi, linfonodi multipli confluenti ecc.) supportati anche da dati radiologici estremamente suggestivi di invasione extranodale. Tuttavia, l'estensione extranodale definita solo radiologicamente non è sufficiente a classificare la malattia ENE+ [7][8]. La presenza di ENE+ patologica incrementa la categorizzazione dello stato linfonodale di un livello rispetto all'inquadramento clinico. In presenza di situazioni ambigue è regola generale adottare la stadiazione inferiore (prognosticamente più favorevole) [9].

La stadiazione patologica, ossia dopo intervento chirurgico, aggiunge informazioni riguardo la prognosi ed è importante ai fini della scelta del trattamento post-operatorio [7][8]. Riguardo alla diffusione linfonodale, le informazioni patologiche dovranno definire oltre alle dimensioni, al numero dei linfonodi interessati ed il livello, anche l'eventuale infiltrazione capsulare [9]. La stadiazione post-operatoria deve inoltre fornire informazioni riguardo i margini di resezione e la presenza di invasione vascolare peritumorale, di embolizzazione linfatica ed interessamento perineurale. Limitatamente alla laringe glottica vengono ritenuti adeguati anche margini inferiori ai 5 mm [9].

2.6 Linee guida di trattamento

La scelta del trattamento primario si basa sui parametri oggettivi del tumore (localizzazione, istotipo e grading, stadiazione secondo i parametri TNM), e i parametri del paziente (età fisiologica, comorbidità, diagnosi precedenti di cancro, professione, outcome funzionale, preferenze personali) [7][13].

In aggiunta allo staging locoregionale, prima di iniziare il trattamento, ogni paziente dovrebbe eseguire una valutazione dello status nutrizionale, delle comorbidità, delle funzioni cardiopolmonare e renale, dello status psicologico e sociale. In caso di malnutrizione, intesa come una perdita di più del 10% del peso corporeo nei sei mesi precedenti alla diagnosi, è raccomandata l'inserzione di un sondino nasogastrico per migliorare la nutrizione per via enterale prima dell'inizio della terapia [7][13].

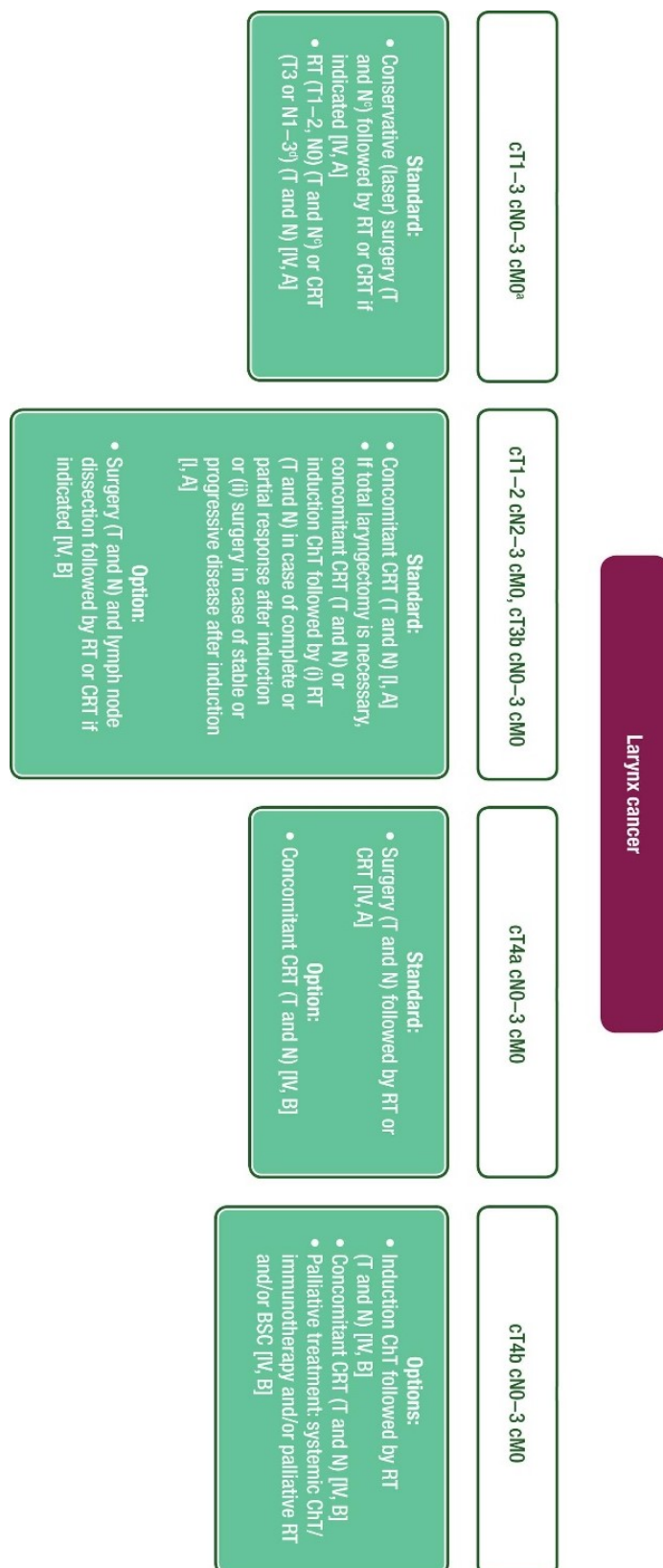


Figura 2.3: Management del cancro laringeo (stadi I-IVB) [7]. BSC, best supportive care; ChT, chemioterapia; CRT, chemio-radioterapia; M, metastasi; N, linfonodo; RT, radioterapia; T, tumore. a. non necessita di laringectomia totale, b. necessita di laringectomia totale, C. neoplasia glottiche cT1e2N0 non necessitano di svuotamento laterocervicali né di RT, d. RT è un'opzione valida per casi selezionati T3 o 3N1 [7].

Sarebbe ottimale discutere la strategia terapeutica con un team multidisciplinare comprendente i chirurghi, i radiologi, gli oncologi, i patologi, ma anche nutrizionisti e psicologi [7]. Le linee guida di trattamento per le neoplasie laringee di stadio I-IVB sono consultabili nella Figura 2.3 [7].

Per quanto possibile, le neoplasie non avanzate andrebbero trattate con approccio unimodale, quindi con la chirurgia o la radioterapia [7][13].

Per le neoplasie glottiche T1-T2 non è necessario lo svuotamento laterocervicale ipsilaterale elettivo (o bilaterale per i tumori vicini alla linea mediana) ed è sufficiente la chirurgia laringea. Questo perché le neoplasie glottiche in fase iniziale hanno scarsa tendenza alla metastatizzazione linfonodale, grazie al fatto che le corde vocali hanno una rete linfatica meno sviluppata del resto della mucosa laringea [7][13].

Le opzioni chirurgiche spaziano dalla chirurgia mini invasiva transorale, anche con l'utilizzo di laser, alle laringectomie parziali open, alle laringectomie totali [1]. Oltre alla chirurgia laringea, per raggiungere la radicalità oncologica, può essere necessario un'operazione di svuotamento laterocervicale, ipsilaterale o bilaterale, in cui si andranno a rimuovere le stazioni linfonodali che sono risultate positive alle indagini diagnostiche e radiologiche e/o le stazioni linfonodali che è più probabile che contengano metastasi [7][13].

I tumori trattati chirurgicamente possono dover necessitare di radioterapia (RT) o chemio-radioterapia (CRT) post-operatoria. Per le neoplasie loco-regionalmente avanzate la chemio-radioterapia ha dato risultati migliori rispetto alla sola radioterapia per quanto riguarda il controllo loco-regionale e la sopravvivenza generale (overall survival OS) [7][13].

Per le neoplasie laringee esiste la possibilità di effettuare una chemioterapia di induzione per la preservazione della laringe, scegliendo fra due possibili approcci: chemio e radioterapia concomitanti oppure chemioterapia di induzione seguita dalla sola radioterapia (Figura 2.4) [7][13].

Le linee guida per il trattamento delle recidive locali e della malattia metastatica sono visualizzabili nella Figura (2.5).

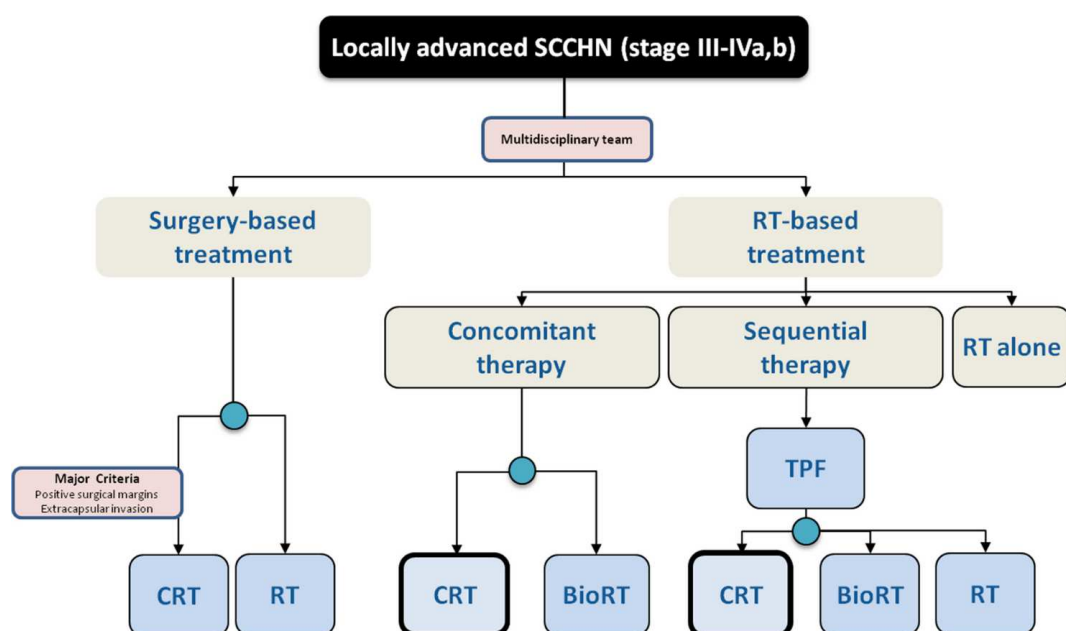
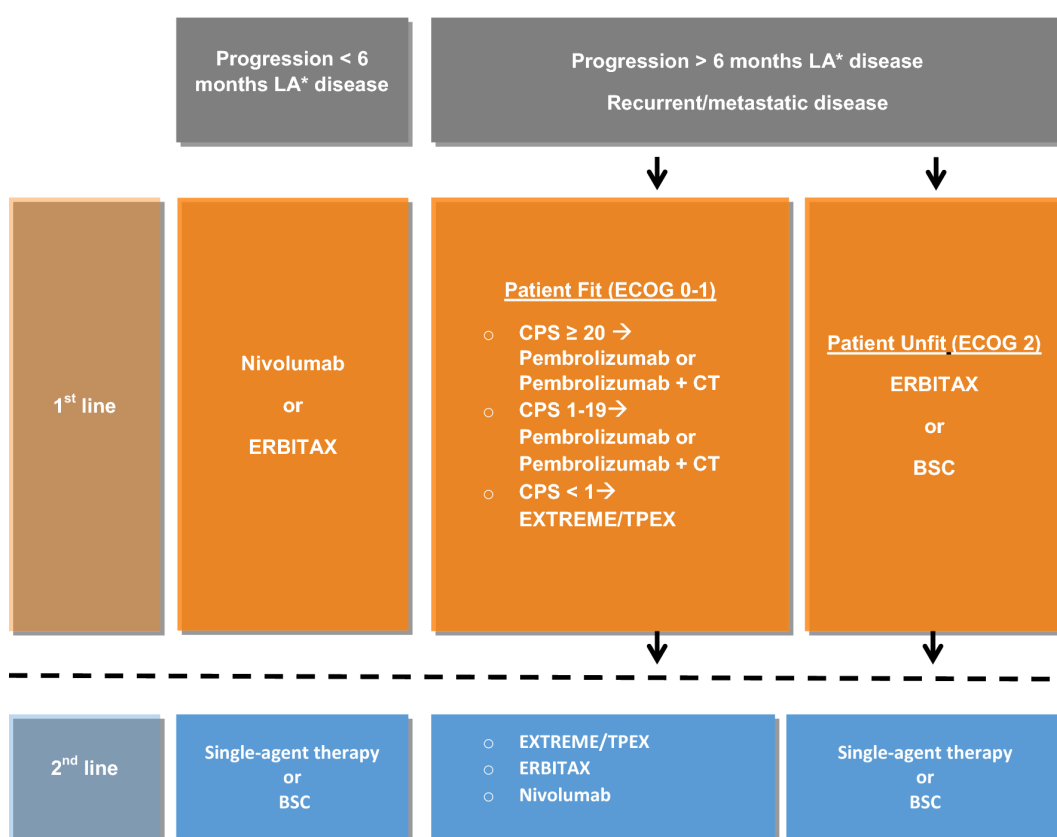


Figura 2.4: Opzioni terapeutiche per la neoplasia laringea localmente avanzata [13].



- LA: Locoregionally advanced
- ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group
- CPS: Combined Positive Score
- BSC: Best Supportive Care
- CT: Chemotherapy
- ERBITAX: combination of paclitaxel and cetuximab
- EXTREME: combination of platinum, 5-Fluorouracil and cetuximab
- TPEX: combination of cisplatin, docetaxel and cetuximab

Figura 2.5: Management delle recidive loco-regionali e/o della malattia metastatica [13].

Capitolo 3

Stroma tumorale, angiogenesi e targeted therapy

3.1 Limiti del TNM staging

Il volume del tumore primario, il volume totale delle metastasi linfonodali, insieme all'età, performance status scadente, grading e profondità dell'invasione tumorale, sono tutti predittori di prognosi sfavorevole. La maggior parte dei pazienti vengono diagnosticati in stati avanzati (più del 75% sono allo stadio III o IV), soprattutto nel caso di neoplasie originate dalla sovraglottide, quando le opzioni terapeutiche attuali hanno un impatto molto meno favorevole sulla prognosi [11].

Oltre ai parametri che caratterizzano lo staging TNM, L'AJCC pone l'attenzione anche su altri parametri (pattern d'invasione del tumore; invasione perineurale; invasione linfovaskolare; comorbidità ecc....) che al momento attuale però, se pur considerati importanti dal punto di vista prognostico, non sono ritenuti tali da poter modificare l'inquadramento TNM del singolo paziente [9].

L'ottava edizione del TNM staging AJCC/UICC ha incluso qualche modifica rispetto alle edizioni precedenti. C'è una forte spinta per includere ulteriori modifiche per poter inquadrare meglio le caratteristiche della neoplasia del singolo paziente e per poter costruire un percorso di cura su misura. D'altro canto, la classificazione WHO è a favore di una semplice classificazione basata sulla differenziazione

istopatologica del grading, nonostante questa informazione abbia uno scarso valore prognostico [14], ed ignora altri fattori quali il pattern di crescita della neoplasia, la tipologia di reazione stromale (desmoplasia, risposta immune) e il tumor-stroma ratio [15] che si sono dimostrati molto promettenti [16].

È evidente come il TNM staging e la classificazione WHO non diano abbastanza informazioni sulle caratteristiche ed il comportamento biologico di un tumore, sull'aggressività e la velocità di evoluzione della neoplasia, e spesso falliscono nell'individuazione delle neoplasie più aggressive, specialmente in stadi precoci (stadi I-II) [16]. Il TNM staging oltre a non prendere in considerazione le condizioni generali del paziente (età, performance status, comorbidità), che sono predittori indipendenti di outcome [10], non prende in considerazione la complessità delle interazioni cellulari e non cellulari del microambiente tumorale, nonostante sia sempre più evidente il ruolo chiave del microambiente tumorale nel determinare la progressione della malattia e l'outcome della terapia [17].

3.2 Componenti del microambiente tumorale

L'idea che i tumori possano essere considerati semplici masse di cellule anormale in proliferazione è obsoleta, al contrario sono tessuti complessi, composti da cellule neoplastiche e da cellule non neoplastiche che interagiscono fra loro [18]. L'interazione fra le cellule tumorali e lo stroma, che comprende la maggior parte del microambiente della massa tumorale, da anni si ritiene che sia critica nella tumorigenesi, nell'angiogenesi tumorale e nella progressione del cancro, oltre che nella metastatizzazione e nello sviluppo di farmaco-resistenza [17]. La combinazione dell'accumulo di mutazioni favorevoli nelle cellule tumorali, talvolta indotte e selezionate dalla terapia, e di cambiamenti nello stroma tumorale guidano e supportano la tumorigenesi [17]. Nell'ambiente tumorale sono riconoscibili molte tipologie cellulari, che presentano caratteristiche che le contraddistinguono dai corrispettivi nei tessuti sani. L'ipotesi che non siano solo innocui bystanders, ma che abbiano ognuno il proprio ruolo attivo all'interno del microambiente tumorale, è sempre più

accreditata e molti studi negli ultimi decenni hanno indagato il ruolo delle singole tipologie di cellule [17][18][19].

Lo stroma è composto principalmente da tessuto connettivo acellulare (matrice extracellulare ECM), che ha il compito di supportare la componente cellulare del tessuto, e da cellule specifiche del tessuto connettivo, fra cui i fibroblasti, gli osteoblasti, i condrociti. Nel microambiente tumorale spesso sono presenti anche cellule non-stromali, quali le cellule endoteliali, i periciti, gli adipociti e le cellule immunitarie. Le cellule endoteliali attraverso l'angiogenesi intra-tumorale provvedono al nutrimento necessario per la crescita tumorale, costituiscono una via per la metastatizzazione e contribuiscono alla resistenza alla radioterapia e alla chemioterapia [17].

Le cellule stromali dei tessuti fisiologici si trovano in uno stato non-proliferativo (da qui l'idea ormai superata che le cellule dello stroma tumorale fossero innocui bystanders), e nei tessuti non tumorali lo stroma ha caratteristiche che sopprimono la crescita tumorale. Lo stroma ha un ruolo nella regolazione di certe attività degli epitelii differenziati, fra le quali la proliferazione e la capacità di invasione della matrice extracellulare, per mantenere stabili le dimensioni degli organi e delle varie strutture al loro interno [20].

Una delle modalità con cui le cellule stromali possono regolare la funzione delle cellule epiteliali è attraverso la secrezione di fattori di crescita, in particolare i fibroblasti possono secernere $TGF\beta$, che in base al contesto può favorire o sopprimere la crescita tumorale [17].

La matrice extracellulare intra-tumorale fa da supporto alla componente cellulare e contribuisce al signalling paracrino. Viene costantemente rimodellata per adattarsi alle necessità della massa tumorale, liberando nel processo i fattori di crescita presenti al suo interno [17].

I fibroblasti presenti nello stroma tumorale (cancer associated fibroblasts CAFs) hanno un fenotipo differente rispetto alla controparte presente nei tessuti sani. Innanzitutto, non sono cellule quiescenti, anzi proliferano, migrano e hanno forma alterata, per certi aspetti sono più simili ai miofibroblasti. I CAFs secernono la maggior parte delle componenti della matrice extracellulare tumorale, e la ECM secreta

dai CAFs è diversa dalla ECM secreta dai fibroblasti sani nei tessuti fisiologici [18]. La matrice extracellulare tumorale solitamente è più rigida e contrattile, promuove la crescita, la sopravvivenza, la migrazione cellulare e l'angiogenesi. I CAFs secernono maggiori quantità di metalloproteasi (MMPs), facilitando la migrazione cellulare nella matrice extracellulare, e maggiori quantità di fattori di crescita, citochine e chemochine ad azione autocrina e paracrina che favoriscono il fenotipo maligno (TGF β , FGFs, HGF, PDGF, VEGF, NF-kB, TNF α , IFN γ , IL-6, SHH, BMPs e molte altre) [17].

Lo stroma tumorale può limitare l'accesso della chemioterapia in tre modi: tramite fibrosi (forma una barriera fisica), tramite elevata pressione interstiziale e il pH più acido [18], tramite degradazione enzimatica dei farmaci. I CAFs possono esprimere determinati citocromi 450 che metabolizzano molte sostanze tossiche fra cui i chemioterapici, ad esempio il CYP3A4 metabolizza il Docetaxel, che è impiegato nel trattamento del LSCC. La ECM tumorale e i CAFs hanno effetti immunomodulatori e possono inficiare l'efficacia dell'immunoterapia (che induce una risposta immune di tipo Th1, con l'obiettivo di eliminare le cellule tumorali che esprimono neoantigeni derivati da mutazioni protumorali) [17].

Le cellule tumorali laringee, nello specifico, inducono la crescita di terminazioni nervose all'interno del tumore rilasciando fattori neurotrofici (principalmente NGF, BDNF) e stimolando direttamente la neurogenesi e la formazione dei neuriti tramite la secrezione di sostanze che fungono da guide assonali [21]. Viceversa, le terminazioni nervose rilasciano fattori di crescita e altre sostanze solubili che attraggono le cellule neoplastiche e ne promuovono la crescita direttamente (ad esempio attraverso l'attivazione delle vie di segnale di NF-kB, PI3K e MAPK) [21]. Entrambi questi processi rientrano nel processo di invasione perineurale (PNI) e promuovono la crescita della neoplasia laringea tramite l'instaurazione di un circolo vizioso [21]. L'invasione perineurale nelle neoplasie laringee influenza il comportamento della risposta immunitaria tramite la secrezione di citochine e chemochine e la regolazione dei geni implicati nella risposta anticorpale [21]. L'invasione perineurale riflette l'invasività del tumore e ha un significativo risvolto prognostico, inoltre il sistema nervoso ha un ruolo attivo nella tumorigenesi e la componente nervosa non

funge solo da “strada” per guidare il fronte invasivo del tumore laringeo [21].

Nell’ambiente tumorale sono presenti anche cellule del sistema immunitario, spesso presentano caratteristiche che le distinguono dalle cellule immunitarie circolanti e residenti nei tessuti sani. I monociti circolanti vengono attratti dalle chemochine rilasciate nell’ambiente tumorale, e dopo l’extravasazione possono modificare il loro fenotipo diventando Tumor-associated Macrophages (TAMs), i quali possono avere un’azione pro-tumorale grazie alla secrezione di fattori che supportano l’angiogenesi e promuovono la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule endoteliali. Fra questi fattori secreti ci sono VEGFA, che attiva direttamente l’angiogenesi, e proteasi che degradano la matrice extracellulare, facilitando la migrazione delle cellule endoteliali e la formazione di neovasi [22]. Oltre ai TAMs anche i neutrofili extravasati nel tumore possono favorire l’angiogenesi [22].

In generale le cellule del sistema immunitario innato e adattativo possono contribuire alla progressione del tumore in certe condizioni [23], ad esempio i linfociti CD4+ possono avere un’azione immunosoppressiva (opposta all’azione citotossica antitumorale dei linfociti CD8+) e rilasciando citochine antiinfiammatorie, fra cui IL-10 e TGF β , e fattori di crescita stimolano la crescita della neoplasia [18].

3.3 TSR come fattore prognostico nei tumori solidi e in precedenti studi su LSCC

La componente stromale delle neoplasie ha quindi importanza nel determinare il comportamento biologico del tumore e le sue caratteristiche possono fungere da potenziali marker prognostici. Il Tumor Stroma Ratio (TSR), definito come la proporzione di tessuto tumorale in relazione al tessuto stromale circostante [16], è un marker prognostico vantaggioso perché può essere valutato con la colorazione standard di ematossilina ed eosina (HE) ed ha una buona riproducibilità inter e intra-osservatori [16].

Negli studi condotti finora, ponendo il cut-off al 50% per distinguere neoplasie ad alto o basso contenuto di stroma (rispettivamente >50% stroma rich/TSR low e

Sn	Tumor site	Year	Conclusion
1	Triple negative breast carcinoma ^[31]	2012	Stroma rich-poor survival Stroma poor- better survival
2	Esophageal SCC ^[32]	2012	Stroma-rich tumors were associated with poor prognosis and an increased risk of relapse
3	Laryngeal SCC ^[8]	2013	No significant difference in survival between low and high TSR
4	Nasopharyngeal carcinoma ^[11]	2014	Stroma rich : poor prognosis
5	Colorectal carcinoma ^[6]	2014	Stroma rich tumors – reduced survival
6	ER+breast carcinoma ^[7]	2014	Stroma rich tumors : better survival.
7	Endometrial carcinoma ^[9]	2015	High TSR (stroma poor): low survival Stroma rich : better survival No correlation between TSR and other parameters.
8	Epithelial ovarian carcinoma ^[10]	2015	Stroma rich tumor- poor prognosis
9	Hepatocellular carcinoma ^[12]	2015	Stroma poor : better survival
10	Cervical carcinoma ^[13]	2015	Stroma-rich tumors had worse prognosis and higher risk of relapse compared with those having stroma-poor tumors.
11	Cervical Adenocarcinoma ^[23]	2015	Low TSR (stroma rich): low survival No correlation between TSR and grade, LVI, PNI or LN metastasis.
12	Non small cell lung carcinoma ^[24]	2015	Stroma rich tumors : poor prognosis and increased risk of relapse.
13	Pancreatic ductal carcinoma ^[25]	2015	Stroma rich tumors- good prognosis
14	Inflammatory breast carcinoma ^[30]	2015	No significant difference in survival with TSR
15	Our cases (Buccal mucosa and tongue SCC)	2016	Significant correlation between TSR and size of the tumor was found with a <i>P</i> value of 0.001 in buccal mucosa SCC cases suggesting higher TSR (stroma poor) to be associated with adverse pathological characteristic i.e; advanced T significantly. No significant correlation between TSR and inflammatory infiltrate with grade of the tumor, lymph node metastasis, LVI and PNI.

SCC: Squamous cell carcinoma, TSR: Tumor-stroma ratio, LVI: Lymphovascular invasion, PNI: Perineural invasion, ER: Estrogen receptor

Figura 3.1: Valore prognostico di TSR in studi precedenti [24].

<50% stroma poor/TSR high) [16][24][25][26] ha dato informazioni prognosticamente significative in una grande varietà di neoplasie solide, fungendo da surrogato della misura dell'attività dello stroma tumorale [24].

TSR è stato studiato in molte neoplasie solide, in particolare in neoplasie di origine epiteliale (vedi Figura 3.1). Nella maggior parte delle neoplasie avere una quantità di stroma >50% (TSR low/stroma rich) è associato a una prognosi peggiore, questo è vero per tumori esofagei [24], del colon-retto, della mammella, nasofaringei, del polmone, della cervice uterina, del fegato [25][26]. Avere una quantità di stroma >50% sembra invece essere associato a una prognosi migliore nel carcinoma duttale pancreatico, nel carcinoma endometriale e nel carcinoma della mammella positivo per il recettore degli estrogeni [24]. La variabilità dei risultati del TSR in tumori diversi suggerisce che lo stroma giochi un ruolo diverso nelle neoplasie epiteliali, e che gli effetti dello stroma sulla prognosi non siano universali [24].

La discrepanza nei risultati per quanto riguarda le neoplasie del distretto della testa e del collo può essere dovuta a vari fattori, ad esempio l'inclusione di popolazioni troppo diverse negli studi, l'utilizzo di criteri valutativi e metodologie diversi [16]. Per il LSCC un elevato contenuto di stroma (TSR low) in studi più recenti è stato associato a una ridotta disease free survival e una ridotta overall survival [16][26].

3.4 Neoangiogenesi: importanza per la crescita e la progressione del tumore

La neoangiogenesi è un processo fisiologico attivo nell'adulto principalmente durante la guarigione delle ferite, lo sviluppo dei follicoli ovarici e del corpo luteo, nella proliferazione dell'endometrio. L'angiogenesi patologica è una componente di molte patologie, dal diabete mellito, all'aterosclerosi, al cancro [27].

Nelle fasi precoci della crescita delle neoplasie solide, queste non necessitano di una neo-vascolarizzazione; questi tumori avascolari non possono crescere oltre i 2-3 mm di diametro [14]. Le piccole dimensioni iniziali permettono al tessuto neoplastico di sostentarsi per semplice diffusione dai vasi adiacenti al tumore. Quando la massa supera la dimensione critica di 2-3 mm inizia a produrre fattori angiogenetici per reclutare le cellule necessarie alla produzione di nuovi vasi sanguigni intratumorali [28]. Nelle lesioni epiteliali precancerose (iperplasia, carcinoma in situ) una lamina basale separa il tumore dal tessuto peritumorale vascolarizzato, e i vasi sanguigni raramente infiltrano la lesione. Nelle neoplasie maligne le cellule tumorali inducono una risposta stromale che comprende anche il rilascio di fattori pro-angiogenetici [22]. Il momento in cui i fattori pro-angiogenetici e anti-angiogenetici non sono più in equilibrio è stato definito "angiogenic switch", e la neoangiogenesi tumorale è il risultato dello squilibrio in favore dei fattori pro angiogenetici [28][29].

Il processo angiogenetico include la migrazione cellulare, la proliferazione, la differenziazione ed anastomosi dei microvasi, la degradazione e riorganizzazione della matrice extracellulare [14]. Per il processo angiogenetico è necessario che le cellule endoteliali acquisiscano un fenotipo mesenchimale e che perdano la polarità apico-basale per avere capacità migratoria [30]. Condizioni di ipossia nella massa tumorale attivano il rilascio di una serie di fattori solubili proangiogenetici, fra cui ad esempio VEGFA, il quale attiva le cellule endoteliali dei tessuti adiacenti legando i recettori VEGFR [22]. Il gradiente di VEGFA guida la formazione di cellule endoteliali mobili e ne indirizza la migrazione verso la massa tumorale. Non contribuiscono alla neoangiogenesi solo le cellule tumorali, ma anche le cellule non tumorali dello stroma [22] (vedi tabella 3.2).

Negli anni 2000 sono stati definiti sei tratti caratteristici che conferiscono alle cellule tumorali la capacità di sopravvivere, proliferare e diffondersi: mantenimento del signalling proliferativo, evasione dai meccanismi inibitori della crescita, resistenza alla morte cellulare, invasività e metastatizzazione, replicazione con caratteristiche di immortalità, ed in fine l'induzione dell'angiogenesi [18]. La progressione da tumore benigno a tumore maligno è quindi tipicamente associata ad un "angiogenic switch", che induce lo sviluppo di un network vascolare infiltrativo in attiva crescita all'interno della massa tumorale e contribuisce al potenziale maligno della neoplasia [22].

Come valutare la neo-angiogenesi: MVD

Sono presenti sufficienti prove a favore della valutazione della microvascular density (MVD) come misura affidabile dell'attività angiogenetica nelle neoplasie solide [27] sia in campioni provenienti da materiali operatori che da biopsie preoperatorie [29][31]. È necessario un metodo standardizzato per l'analisi quantitativa di MVD, per permettere la riproducibilità e la comparabilità fra osservatori e centri diversi. È necessario standardizzare la selezione dei campioni di tessuto rappresentativi, il processamento dei campioni e le metodiche di immunocolorazione, la selezione delle aree adatte alla misurazione del numero di microvasi e le modalità per il conto dei vasi [27].

Che marker usare per la misurazione della MVD

La valutazione della MVD necessita di una colorazione che renda evidenti i microvasi, il metodo migliore prevede l'immunocolorazione delle cellule endoteliali. Un marker che sia specifico al 100% per la vascolarizzazione tumorale probabilmente non esiste, per cui i marker che vengono utilizzati per evidenziare la vascolarizzazione hanno specificità e sensibilità variabili [27] (vedi Figura 3.3). Ci sono marker panendoteliali che reagiscono con ogni tipo di endotelio, sia fisiologico che patologico, sia che sia in proliferazione attiva sia che sia stabilizzato. Questi marker panendoteliali sono ad esempio CD31, CD34, il fattore VIII. La colorazione

TME component	Main angiogenesis regulators produced by TME component	Effects of TME component on TABVs
Macrophages	VEGFA, FGF2, CXCL8, CXCL12, PIGF, VEGFC, IL-1 β , IL-6, TNF, WNT7B, MMPs and cathepsins	Pro-angiogenic; induce EC proliferation, migration and survival, as well as ECM remodelling, to facilitate sprouting angiogenesis
	CXCL9, CXCL10, CXCL11 and TNF	Potentially angiostatic under the influence of IFN γ and other T _H 1 cytokines
Neutrophils and MDSCs	VEGFA, FGF2, BV8 and MMP9	Pro-angiogenic; the role is well established during early tumour stages or after therapeutic neutralization of VEGFA
Mast cells	FGF2, VEGFA, TNF, CXCL8, chymase, tryptase and MMP9	Pro-angiogenic during the transition from non-angiogenic to angiogenic tumours
Eosinophils	VEGFA, FGF2, IL-6, CXCL8 and MMP9	Potentially pro-angiogenic, but relevance for tumour angiogenesis unclear
T _H 2 cells	IL-4	Potentially pro-angiogenic by stimulating the alternative (M2-like) activation of TAMs
T _H 1 cells	IFN γ	Potentially angiostatic through the induction of CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in TAMs or via direct angiostatic or anti-angiogenic effects on ECs
T _H 17 cells	IL-17	Pro-angiogenic by inducing CAFs to release CSF3, which recruits pro-angiogenic neutrophils
T _{reg} cells	VEGFA	Pro-angiogenic
B cells	VEGFA, FGF2, MMP9 and IgG	Potentially pro-angiogenic, either directly or via IgG-dependent recruitment and activation of myeloid cells
	Anti-VEGFA or anti-ANGPT2 IgG	Potentially angiostatic through the production of autoantibodies against pro-angiogenic cytokines in the context of immunotherapy
NK cells	VEGFA	Potentially pro-angiogenic, but relevance for tumour angiogenesis unclear
Platelets	VEGFA, PDGFB, FGF2 and CXCL12	Pro-angiogenic
	THBS1, PAI1, endostatin and ANGPT1	Potentially angiostatic
Pericytes	VEGFA, ANGPT1 and ECM components	Promote EC survival and, possibly, proliferation; they may contribute to stabilization of TABVs
CAFs	VEGFA, PDGFC, FGF2, CXCL12, osteopontin and CSF3	Pro-angiogenic, both directly and indirectly by recruiting myeloid cells and through ECM production
Adipocytes	Adipokines and free fatty acids	Pro-angiogenic and pro-inflammatory; stimulate peri-tumoural angiogenesis
ECM	Periostin, tenascin C, fibronectin, osteopontin and CCN-family proteins	Pro-angiogenic through the storage and concentration of pro-angiogenic factors, and recruitment of pro-angiogenic leukocytes
	THBS1, osteonectin, decorin, proteolytic fragments of type IV and XVIII collagens	Potentially angiostatic
Hypoxia	HIF-inducible genes: VEGFA, CXCL12 and ANGPT2	Pro-angiogenic
Metabolites	Lactate	
	H ⁺	Pro-angiogenic through increased expression and stabilization of VEGFA mRNA
ROS	Free radicals and non-radical ROS	Potentially pro-angiogenic by enhancing HIF1 transcription and the expression of pro-angiogenic and pro-inflammatory factors; they also generate pro-angiogenic lipid oxidation products
Tumour-derived EVs	Various pro-angiogenic and inflammatory mediators, ECM-remodelling enzymes and mitogenic factors for ECs	Potential pro-angiogenic effects mediated via contacts with, or transfer of their cargo to, ECs; relevance for tumour angiogenesis unclear

Figura 3.2: Regolatori dell'angiogenesi nel microambiente tumorale [22].

Antibody	Sensitivity	Specificity	Reactivity	
			Frozen	Paraffin
Anti-CD31	Stain small and large vessels with equal intensity	Non-specific in cryostat sections – occasional plasma cell staining in formalin fixed tissue, no lymphatic staining	Positive	Positive
Anti-FVIII-RA	Variable staining of large vessels and capillaries, polyclonal antibody more sensitive	Monoclonal antibody more specific, stromal staining with polyclonal antibody	Positive	Positive
Anti-Thrombomodulin	Most sensitive for vascular tumours e.g. angiosarcomas	Stains squamous epithelial cells	Positive	Negative
Anti-CD34	Stains small and large vessels with equal intensity in normal and tumour tissue	High, some lymphatic and perivascular stromal staining	Positive	Positive
E9 to CD105 (activated)	Small intra-tumoural vessels positive, large vessels negative	Weak normal tissue vessel staining	Positive	Positive (fixation dependent)
LM609 to integrin $\alpha_v\beta_3$ (activated)	Preferentially stains small calibre blood vessels in neoplastic tissue	Weak expression in blood vessels of normal tissues	Positive	Positive (fixation dependent)
TEC-11 to endoglin (activated)	> 80% of tumour vessels positive	Weak staining of normal endothelial cells, weak stromal staining	Positive	Negative

Figura 3.3: Caratteristiche immunoistochimiche degli anticorpi cellule endoteliali-specifici [27].

con CD31 ad esempio determina anche la colorazione di cellule infiammatorie che esprimono CD31, che possono essere distinte sulla base di differenze morfologiche [27].

Un marker più specifico per la vascolarizzazione tumorale in fase proliferativa, quindi per la neoangiogenesi tumorale, è CD105 (anche detto endoglin/ENG) [32].

Hot spot vascolari

Gli hot spot vascolari sono regioni all'interno del tumore con densità vascolare elevata, sono identificabili a basso ingrandimento (10-100x). La valutazione della MVD utilizzando solo alcune aree selezionate per la loro rappresentatività è un metodo più pratico rispetto al conto della vascolarizzazione complessiva. Per questo la MVD può essere stimata facendo la media del numero delle singole strutture vascolari contate in tre hot spot ad alto ingrandimento (400x) [27].

Per selezionare i tre hot spot più significativi è necessaria l'ispezione di tutto il materiale tumorale disponibile. Per essere considerato nel conto, un microvaso non deve necessariamente avere un lume visibile, né avere al suo interno dei globuli rossi, basta che siano presenti cellule endoteliali, singole o in cluster, che siano

chiaramente separate dai microvasi adiacenti, e che siano chiaramente distinguibili dalle cellule tumorali e dalle altre cellule dello stroma. Anche se cluster vicini danno l'impressione di fare parte degli stessi microvasi tagliati più volte nello stesso piano, vanno contati come microvasi separati [27].

3.5 CD31 Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)

Il gene PECAM1, localizzato sul cromosoma 17q23.3, codifica per la platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1), anche conosciuta come cluster di differenziazione 31 (CD31) [33]. È una proteina altamente glicosilata con una massa di 130 kDa, appartiene sia alle glicoproteine transmembrana tipo I che alla superfamiglia delle immunoglobuline. È composta da:

- Una porzione N-terminale di 574 aminoacidi formata da sei domini Ig-like extracellulari, con nove potenziali siti di N-glicosilazione
- Una regione transmembrana ad α elica singola di 19 aminoacidi
- Una porzione C-terminale intracellulare di 118 aminoacidi che contiene due residui tirosinici, uno per ogni immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs) [34].

Questa proteina viene espressa principalmente dalle cellule endoteliale e dai trombociti, inoltre è espressa nelle cellule dell'immunità innata (monociti, neutrofili, NK cells) e dell'immunità adattativa (cellule T e B) [33].

CD31 svolge il ruolo di molecola di adesione principalmente nelle giunzioni cellulari fra cellule endoteliali, tramite un legame trans-omofilico fra due PECAM-1. Il legame CD31-CD31 porta alla fosforilazione dei due residui tirosinici e richiama due SHP-2, le quali a loro volta defosforilano la β -catenina. In questo modo la β -catenina può ri-associarsi con le VE-caderine ed il risultato finale è la stabilizzazione delle giunzioni cellulari [34].

Fisiologicamente CD31 ha un ruolo nella diapedesi e nella stabilizzazione dell'endotelio e della barriera endoteliale. CD31 è un marker panendoteliale, espresso sia da vasi sanguigni neoformati che da cellule endoteliali dei vasi maturi e stabili [33].

3.6 Endogлина (CD105)

Il gene che codifica per CD105 è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 9 (9q34.11) [14]. L'Endogлина (ENG o CD105) è una glicoproteina transmembrana di tipo I da 180 kDa, ha la funzione di co-recettore di tipo III per i ligandi della superfamiglia dei Transforming Growth Factor ($TGF\beta$) [19].

Il prodotto del gene è una glicoproteina integrale di membrana da 658 aminoacidi, strutturata come un omodimero collegato da ponti disolfuro. Il livello di glicosilazione può variare fra i tessuti, per cui il peso finale di ogni subunità può variare fra i 90 e i 95 kDa. La proteina è organizzata in una regione extracellulare da 586 aa che contiene la porzione N-terminale, un dominio idrofobico transmembrana da 25 aa, e da una coda citoplasmatica di lunghezza variabile [19]. La porzione extracellulare contiene un dominio orfano (aa da 26-330) ricco di residui che possono essere n-glicosilati, una zona pellucida (ZP)-like domain (aa da 349-576). Questo ZP-like domain contiene un tripeptide arginina-glicina-acido aspartico (RGD) che è tipicamente presente in proteine associate alla matrice extra cellulare, ed è una sequenza riconosciuta dalle integrine e importante per l'adesione cellulare [19].

L'mRNA del gene ENG può andare incontro a splicing alternativo e produrre due isoforme che differiscono per la lunghezza della coda citoplasmatica: 14 aa per Short-ENG (S-ENG), 41 aa per Long-ENG (L-ENG). L-ENG è quantitativamente più espressa di S-ENG, e le due isoforme attivano la trascrizione di geni target differenti [35], L-ENG attraverso la pathway ALK1, S-ENG attraverso la pathway ALK5 [20].

ENG svolge un ruolo cruciale nella regolazione della pathway di $TGF\beta$. Questa pathway regola la proliferazione, la differenziazione e l'apoptosi. La superfamiglia di $TGF\beta$ comprende: $TGF\beta$ (1, 2 e 3), le Bone Morphogenic Proteins (BMPs), le

Activine (A e B), i Growth Differentiation Factors (GDFs). Ci sono sette recettori per TGF β tipo I (TGF β RI: activin like kinasis ALKs 1-7), e cinque recettori per TGF β tipo II (TGF β RII) [20]. L'attivazione di ALKs differenti provoca l'attivazione a valle di differenti R-SMADs, ad esempio ALK5 attiva la fosforilazione di SMAD2 e SMAD3, ALK1 attiva la fosforilazione di SMAD1 SMAD5 e SMAD8. Le SMAD fosforilate legano SMAD4 e traslocano nel nucleo, dove andranno a modulare la trascrizione di specifici geni target. Nel caso di attivazione non canonica del signalling di TGF β , vengono attivate diverse chinasi, fra le quali MAPK, ERK, JNK, PI3K, ROCK [35].

ENG, nel suo ruolo di co-recettore, forma un eterodimero con TGF β RI e TGF β RII, modulando l'interazione ligando-recettore. In associazione con TGF β RI, ENG può legare BMP-2, BMP-9 e BMP-10; in associazione con TGF β RII ENG può legare TGF β 1, TGF β 3, activin A, BMP-7. Dopo il legame col ligando, TGF β RII fosforila due serine citoplasmatiche di ENG, e questo porta a valle alla fosforilazione di R-SMADs [19].

ENG svolge un ruolo essenziale nello sviluppo embrionale, tanto che i modelli murini knock out per ENG muoiono negli stadi embrionali iniziali [20][35]. ENG è espressa nel mesoderma e regola l'ematopoiesi nelle fasi iniziali della gestazione (pathway ALK1-SMAD1/5) ed in particolare è necessaria per un'adeguata mieloipoiesi ed eritropoiesi, inoltre ENG è fondamentale per la differenziazione di cellule staminali mesenchimali multipotenti (MSCs) [19]. La telangiectasia emorragica ereditaria (HHT), anche detta sindrome di Osler-Weber-Rendu, è una malattia autosomica dominante dovuta alla mutazione dell'endoglin (HHT-1) o di ALK1 (HHT-2) o di SMAD4, che sono proteine implicate nel signalling a valle di ENG [20]. Le lesioni più caratteristiche dell'HHT sono piccole teleangiectasie mucose e cutanee e per questo possono sperimentare epistassi ripetute. Lesioni simili possono essere presenti lungo la mucosa del tratto gastrointestinale e causare sanguinamenti ricorrenti. Alcuni pazienti presentano malformazioni arterovenose a livello polmonare che possono provocare shunt destro-sinistro di rilievo, con dispnea, astenia, cianosi o eritrocitosi. Le malformazioni arterovenose cerebrali o spinali si manifestano in alcune famiglie e possono causare emorragie subaracnoidee, convulsioni

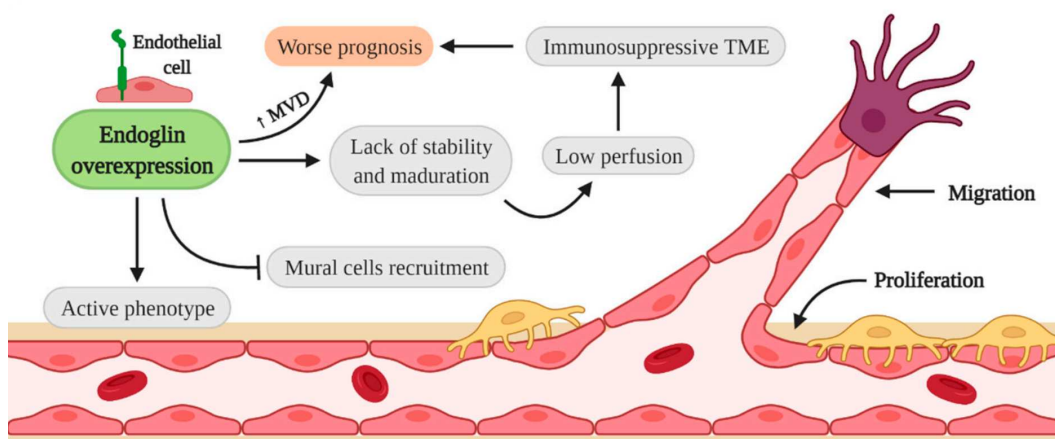


Figura 3.4: Ruolo dell'endoglina nell'angiogenesi [18].

o paraplegia. Presentano anche una conta linfocitaria ridotta e difetti nelle cellule polimorfonucleate e monocitiche, per cui hanno un aumentato rischio di sviluppare infezioni batteriche severe [20]. Nell'adulto ENG è principalmente espressa dal tessuto vascolare attivato, inoltre può essere espressa: dal sinciziotrofoblasto, dai proeritoblasti immaturi, dai macrofagi, dalle cellule stromali del midollo osseo, dalla muscolatura liscia dei vasi, dalle cellule staminali mesenchimali, dai fibroblasti, dalle cellule mesangiali, dalle cellule staminali ematopoietiche, dai condrociti, dai cheratinociti, dalle cellule di Ito, dai mastociti [19]. La proteina Sp1 è necessaria per la trascrizione basale di ENG e per l'induzione della trascrizione ad opera di $TGF\beta$ nelle cellule mesangiali, nelle cellule progenitrici ematopoietiche, nelle cellule muscolari lisce dei vasi, nelle cellule stromali [19].

L'ipossia è un fenomeno che induce la trascrizione di ENG nell'endotelio; questo meccanismo protegge le cellule endoteliali dall'apoptosi e supporta l'angiogenesi. A valle del promotore del gene ENG c'è una sequenza che può legare HIF- α in condizioni di ipossia e promuovere la trascrizione di ENG [20]. Anche $TGF\beta$ e BMP-9 attivano la trascrizione dell'endoglina. Nelle cellule endoteliali, ENG promuove il segnale di $TGF\beta/ALK1-SMAD1/5$ e indirettamente inibisce la pathway di segnale $TGF\beta/ALK5$, con il risultato finale di stimolare la proliferazione delle cellule endoteliali e quindi sostenendo il processo angiogenetico [20]. Proprio per questo ENG è espressa in abbondanza nelle cellule endoteliali in attiva proliferazione (vedi Figura 3.4).

L'aumentata espressione di L-ENG antagonizza l'inibizione della proliferazione delle cellule endoteliali mediata da $TGF\beta 1$. La pathway mediata da $TGF\beta 1$ inibisce anche la proliferazione dei mioblasti, dei monociti tissutali, dei fibroblasti. ENG controlla la migrazione delle cellule endoteliali durante il rimodellamento vascolare e la neoangiogenesi in modo autocrino anche tramite la modulazione del signalling del recettore VEGFR-2 indotto da VEGF-A [19]. Al contrario, dove è più espressa S-ENG sembra che questa abbia un ruolo nell'attivazione del programma di senescenza delle cellule endoteliali [20].

I tumori possono comunicare con il loro microambiente tramite la secrezione di specifiche molecole, che promuovono la crescita del tumore stesso, la formazione di nicchie pre-metastatiche e di metastasi. I fattori solubili sono quindi fondamentali per il crosstalk fra cellule tumorali e cellule stromali. È stata identificata una forma solubile di endoglin, chiamata Sol-ENG, formata dal clivaggio del dominio extracellulare di ENG ad opera della metalloproteasi MMP-14 e MMP-12 [20]. Pare che Sol-ENG abbia azione antiangiogenica, poiché lega con alta affinità i ligandi di $TGF\beta$ (BMP-9 e BMP-10) [18], sequestrandoli e bloccando l'attivazione del signalling di $TGF\beta$. Sol-ENG può disturbare il remodelling e il mantenimento dei vasi sanguigni, risultando nella formazione di anomalie vascolari [20]. Il ruolo di Sol-ENG in ambito oncologico è ancora controverso e non del tutto compreso, tanto che per alcune neoplasie solide elevati livelli di Sol-ENG sono correlati a prognosi peggiore [19]. Lavori più recenti hanno dimostrato che oltre ad agire sequestrando i ligandi di L-ENG, e quindi come anti-angiogenetico, Sol-ENG monomero può potenziare il signalling di BMP-9 nelle cellule endoteliali e quindi favorire l'angiogenesi [20].

L'endoglin può legare le integrine espresse sulla superficie dei leucociti, e gioca un ruolo nella diapedesi. Sol-ENG può legare le stesse integrine e impedire l'extravasazione leucocitaria [20].

Cellule che esprimono CD105 nel microambiente tumorale

Le cellule che esprimono CD105 nell'ambiente tumorale sono principalmente le cellule endoteliali, oltre a queste anche altre tipologie di cellule possono esprimere

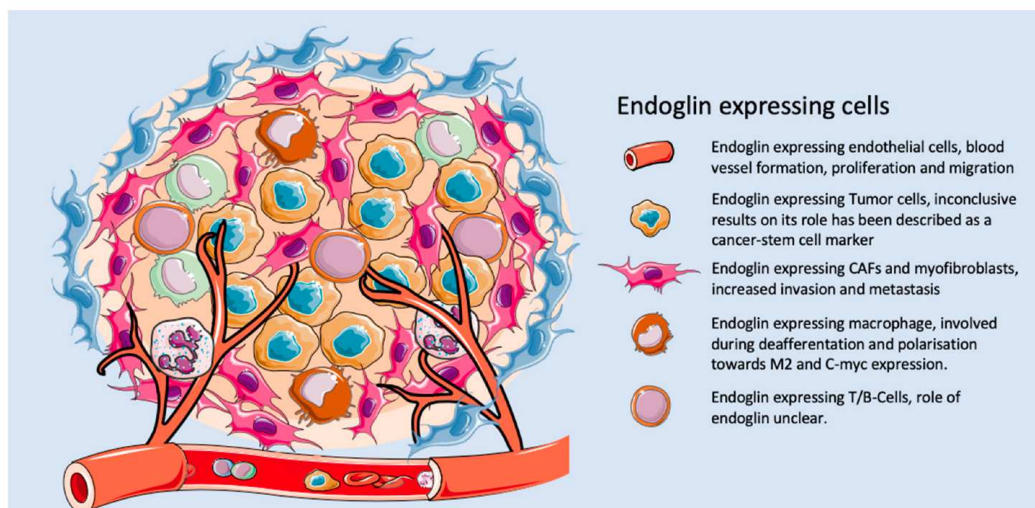


Figura 3.5: Ruolo dell'endoglina in varie componenti cellulari dell'ambiente tumorale [20].

CD105 [22]. I fibroblasti attivati nei tessuti non neoplastici (ad esempio dove c'è una ferita da guarire) sono caratterizzati da un aumento del signalling di $TGF\beta$, e ENG gioca un ruolo in questo contesto fisiologico [20]. ENG è espresso anche dai Cancer Associated Fibroblasts (CAFs). Il signalling di $TGF\beta$ (tramite ALK5) è uno degli stimoli più potenti per l'attivazione dei CAFs, che a loro volta aiutano la progressione della neoplasia stimolandone la crescita attraverso la secrezione di fattori pro-invasivi, pro-metastatici e pro-angiogenici [20]. ENG è un marker delle cellule staminali mesenchimali e gioca un ruolo cruciale nel mantenimento delle proprietà cellula-staminale simile dei CAFs [19].

Anche le cellule tumorali e alcune sottopopolazioni di cellule del sistema immunitario possono esprimere CD105 [18], le caratteristiche morfologiche delle singole popolazioni di cellule permettono di distinguerle all'analisi istologica (vedi Figura 3.5).

3.7 MDV e importanza come fattore prognostico in altri tumori e in studi precedenti su LSCC

Quando l'espressione di ENG corrisponde ad un'elevata MVD, questo è stato correlato ad una prognosi peggiore in molte neoplasie: corticosurrenaliche pedia-

triche, rabdomiosarcomi pediatrici, astrocitomi e glioblastomi, epatocarcinomi, carcinomi mammari, polmonari, prostatici, del colon-retto [36], ovarici, gastrici, endometriali, esofagei, renali [36] e in carcinomi squamocellulari del distretto della testa e del collo [19]. L'iperespressione continua di ENG in modelli murini promuove l'attivazione delle cellule endoteliali e stimola l'angiogenesi, contrasta la maturazione e la stabilizzazione dei neovasi, con conseguente formazione di vasi più permeabili. Il continuo signalling proangiogenico fa sì che i vasi sanguigni formati all'interno della massa tumorale abbiano una morfologia aberrante. Questi vasi sono caratterizzati da eccessive ramificazioni e rigonfiamenti, da vasi che terminano improvvisamente senza continuare in un circolo venoso, da un rivestimento di cellule endoteliali discontinuo, da una membrana basale alterata e scarso rivestimento da parte dei periciti [22]. L'eccessiva fenestrazione di questi neovasi ne aumenta la permeabilità e facilita l'intra e l'extravasazione delle cellule tumorali [22], contribuendo all'aumentato rischio di recidive locoregionali, di disseminazione metastatica e in generale ad un peggioramento della prognosi [19].

Talvolta ci sono stati risultati contraddittori riguardo il significato clinico della MVD nei carcinomi squamocellulari della testa e del collo, questo è però dovuto alla differenza nei protocolli di trattamento e nei marker utilizzati per le colorazioni immunoistochimiche [14][32].

Studi precedenti sul valore prognostico di CD105 nelle neoplasie laringee in particolare hanno trovato CD105-assessed MVD più elevata sia un predittore di prognosi sfavorevole. CD105-assessed MVD più elevata è associata a recidive locoregionali più frequenti [10].

Nelle neoplasie laringee il tasso di recidive e la Disease Free Survival (DFS) sono correlate alla CD105-assessed MVD, ma non ad altri marker espressi dalla vascolatura tumorale, quali ad esempio il vascular endothelial growth factor 2 (VEGF2) [14], l'angiogenina e l'epidermal growth factor receptor EGFR [37]. Per poter programmare un piano terapeutico migliore possibile è importante studiare le caratteristiche del tumore già quando si ha a disposizione solo i campioni biotipici prelevati dal tumore primario. Studi precedenti hanno dimostrato che la CD31- e la CD105-assessed MVD hanno una buona concordanza fra le biopsie preoperatorie e

i materiali operatori, nonostante le ridotte dimensioni dei campioni biotici ottenuti tramite microlaringoscopia [29].

CD31 è meno specifico di CD105 per la valutazione di MVD, ma come marker prognostico è ugualmente utile [38], la CD31-assessed MVD dà informazioni sovrapponibili a quelle date dalla CD105-assessed MVD. CD31 è però più diffuso ed ha una migliore standardizzazione di CD105, oltre ad avere un costo inferiore [29]. La possibilità di ottenere informazioni prognostiche dalla valutazione di biomarker già a partire dall'analisi immunoistochimica della biopsia preoperatoria è particolarmente rilevante nel LSCC [31]. Al momento la radioterapia adiuvante si somministra solo in presenza di determinati fattori di rischio: margini chirurgici positivi (R1), invasione perineurale e/o angiolinfatica, pT4 o pT3 solo per neoplasie sovraglottiche, $N \geq 2$. In assenza di questi fattori di rischio anche tumori localmente avanzati, che si estendono oltre l'area postcricoidea o negli spazi preepiglottico o paraglottico, sono considerati trattabili con la sola chirurgia. Lo studio dei markers biologici nelle biopsie è utile per individuare la sottopopolazione di pazienti con LSCC a più alto rischio di recidive locali, che potrebbero trarre giovamento da una linea di trattamento primaria più aggressiva [31].

3.8 Targeted therapy contro CD105

Molte terapie oncologiche hanno come target specifico le cellule maligne, e non considerano le cellule non cancerogene residenti nel microambiente tumorale. Nelle situazioni in cui lo stroma tumorale promuove il cancro e induce resistenza alle terapie standard, l'utilizzo di terapie mirate contro le componenti dello stroma potrebbe dare benefici. Andando a colpire solo lo stroma probabilmente non si riuscirebbe ad eliminare l'intero tumore, per questo gli agenti chemioterapici specifici per lo stroma andrebbero usati in combinazione con agenti citotossici per le cellule tumorali [17]. Le terapie mirate contro ENG includono l'uso di: anticorpi monoclonali, coniugati anticorpo-farmaco, anticorpi anti-ENG radiomarcanti, vaccini ENG-based. Il Carotuximab (TRC105) è un anticorpo monoclonale progettato per bloccare l'ENG umana competendo con il ligando BMP-9, andando a bloc-

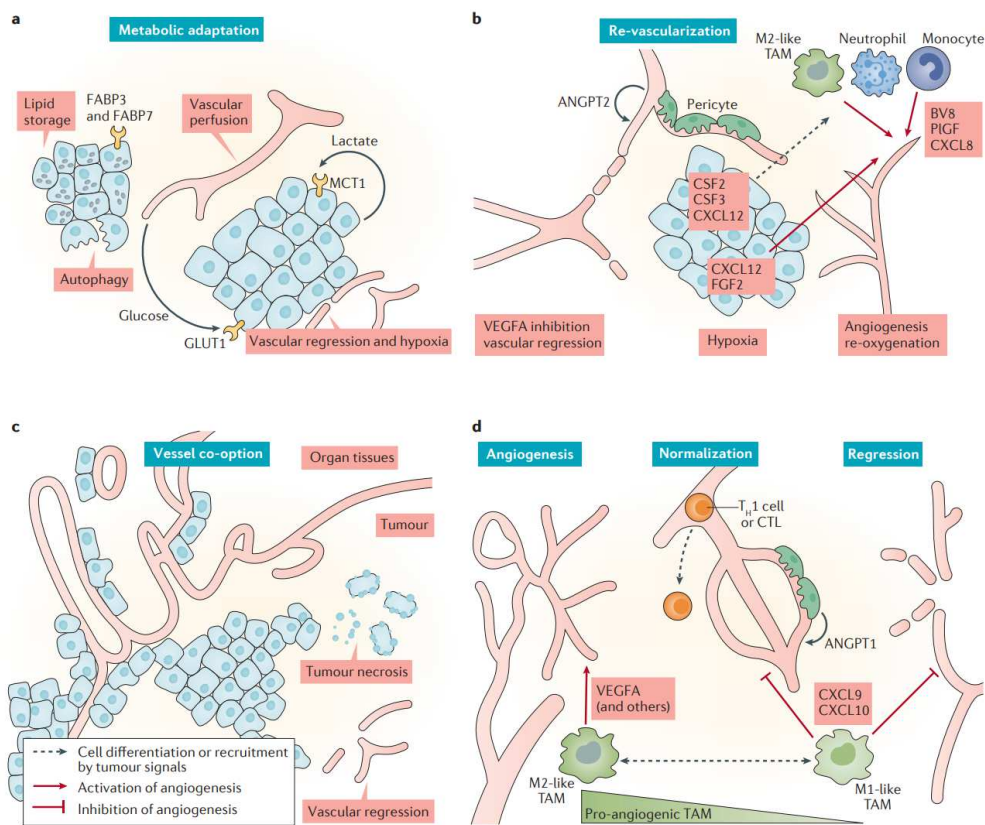


Figura 3.6: Meccanismi di resistenza agli inibitori dell'angiogenesi a) adattamento metabolico; b) rivascularizzazione tramite induzione di fattori di crescita pro-angiogenetici alternativi; c) vascular co-option; d) normalizzazione vascolare [18].

care l'attività di co-recettore per $TGF\beta$ [36]. TRC105 induce tossicità cellulare anticorpo-dipendente nelle cellule endoteliali e nelle cellule tumorali e dello stroma tumorale che esprimono CD105. Attualmente TRC105 è in studio in trial clinici di fase I-II-III, si spera di poterla utilizzare per il trattamento di molti tumori in fase avanzata, fra cui anche tumori del distretto testa-collo [19][36].

Attualmente sono già presenti terapie antiangiogeniche, fra le quali le più comuni sono le terapie anti-VEGF (fra cui il Bevacizumab). Le cellule tumorali possono sviluppare resistenza a questa terapia in condizioni di ipossia, ad esempio grazie al passaggio a un'angiogenesi VEGF-indipendente che prevede l'aumento dell'espressione di CD105 (vedi Figura 3.6). TRC105 potrebbe essere una terapia di salvataggio in queste neoplasie resistenti all'inibizione di VEGF [19]. Sono in corso studi che hanno lo scopo di testare l'efficacia della combinazione di TRC105

con terapie standard in diversi tipi di tumori. Fra queste terapie standard ci sono agenti chemioterapici (Carboplatino e Paclitaxel) e inibitori di VEGF (Bevacizumab, Sorafenib, Pazopanib). I dati preliminari sembrano indicare che le terapie combinate sono efficaci in pazienti refrattari alla prima linea di trattamento [19].

ENG, in risposta allo stress indotto dalla radioterapia, attiva la DNA damage response e l'adattamento metabolico attraverso la regolazione della via della sirtuina 1 (SIRT1), inducendo resistenza al trattamento. In dei modelli di xenotrapianto di cancro della prostata, associando TRC105 alla radioterapia si riduceva significativamente la crescita del tumore [19]. Dagli studi condotti finora, pare che la forma solubile di ENG (Sol-ENG) abbia azione inibitoria sulla neoangiogenesi. TRC105, successivamente al legame con ENG, fa sì che ENG sia associata a MMP-14, favorendo l'azione della proteasi. L'induzione del taglio enzimatico di ENG, con successivo rilascio di Sol-ENG, sembra essere uno dei meccanismi tramite cui TRC105 inibisce l'angiogenesi [19].

Le terapie anti CD105 oltre a colpire le cellule endoteliali, potenzialmente potrebbero colpire anche tutte le altre cellule del microambiente tumorale che esprimono CD105, primi fra tutti i CAFs, andando a bloccare il loro contributo al cancro [20]. I componenti del microambiente tumorale possono essere determinanti nell'outcome di terapie quali l'immunoterapia, e l'endoglina stessa sembra avere un ruolo nella formazione di un microambiente tumorale immunosoppressivo [18]. La terapia anti CD105 potrebbe avere un impiego anche nel miglioramento dell'efficacia dell'immunoterapia (ad esempio Pembrolizumab e Nivolumab) tramite il meccanismo di vessel normalization [18].

Capitolo 4

Scopo dello studio

L'interazione fra le cellule tumorali e lo stroma, la componente principale del microambiente tumorale, si ipotizza sia cruciale nella tumorigenesi, per la neoangiogenesi tumorale e per la progressione della neoplasia [39]. Il tumor-stroma ratio (TSR), definito come la proporzione fra il tessuto tumorale e il tessuto stromale circostante, è recentemente stato introdotto come fattore prognostico importante in molte neoplasie solide [40]. Il TSR può essere valutato dopo colorazione standard del tessuto con ematossilina ed eosina secondo il metodo standardizzato per le neoplasie del colon [41]. Il TSR ha una buona riproducibilità inter-osservatore [41] e fornisce informazioni prognostiche anche nei tumori della testa e del collo [16]. Per quanto riguarda i carcinomi squamocellulari della laringe [26][42], i tumori stroma-rich sembrano preliminarmente avere una prognosi peggiore.

L'angiogenesi tumorale, intesa come la formazione di nuovi vasi sanguigni peritumorali ed intra-tumorali, è fondamentale per la progressione delle neoplasie maligne solide. Il processo angiogenico include: la migrazione cellulare, la proliferazione, la differenziazione, la genesi dei microvasi e la loro anastomosi, la degradazione della matrice extracellulare e la riorganizzazione strutturale. L'angiogenesi tumorale è il risultato di uno squilibrio fra fattori pro- e anti-angiogenici prodotti sia dalle cellule tumorali che dalle cellule normali [28][30]. I cancer-associated fibroblasts (CAFs), che sono la principale componente cellulare dello stroma, è verosimile che contribuiscano alla neoangiogenesi tumorale attraverso la proteomica e la degra-

domica [43]. La valutazione della densità microvascolare (MVD) è una metodica molto diffusa per quantificare la densità dei vasi sanguigni presenti nel tessuto tumorale e riflette l'intensità della neoangiogenesi [44]. La stima della MVD si basa sull'uso di determinati marker presenti sulla superficie delle cellule endoteliali, fra i quali CD31, CD34, il fattore VIII, che evidenziano le strutture vascolari [27]. Questi marker pan-endoteliali non reagiscono solo con i vasi in proliferazione, ma anche con la vascolatura matura. L'endoglina (CD105) è una componente del complesso recettoriale del transforming growth factor (TGF)- β 1, una citochina pleiotropica che modula l'angiogenesi tramite la regolazione di diverse funzioni cellulari, fra cui la proliferazione, la migrazione e la differenziazione [45]. Gli anticorpi anti CD105 reagiscono preferenzialmente con le cellule endoteliali attive del tessuto angiogenico delle neoplasie [46]. CD105 è stato studiato recentemente in diverse neoplasie delle vie respiratorie superiori ed è considerato un importante predittore indipendente di outcome clinico nei carcinomi squamocellulari della cavità orale e della laringe, e in altre neoplasie della testa e del collo [28][47]. Negli ultimi anni il gruppo di ricerca si è concentrato sulla valutazione della neoangiogenesi nei carcinomi squamosi laringei [31][48][49][50], utilizzando soprattutto materiali operatori.

Dato l'impatto del potenziale prognostico e terapeutico del TSR e della neoangiogenesi, la loro espressione dovrebbe essere valutata nei carcinomi squamocellulari laringei già nel work-up diagnostico iniziale quando è disponibile solo il materiale biotico. Gli obiettivi di questo studio sono:

- La valutazione della concordanza fra le variabili istopatologiche (il Tumor Stroma Ratio) e immunoistochimiche (la densità microvascolare) nelle biopsie preoperatorie e nei corrispondenti materiali operatori provenienti da carcinomi squamocellulari laringei primari;
- Valutare l'associazione fra l'interazione tumore-stroma (quantificata con TSR) e l'angiogenesi (quantificata con CD31- e CD105-assessed MVD), e le variabili clinico-patologiche convenzionali;

- La determinazione del ruolo prognostico di TSR e MVD valutati nelle biopsie preoperatorie e nei corrispondenti materiali operatori.

Capitolo 5

Materiali e metodi

5.1 Popolazione in studio

Lo studio è stato condotto in accordo con i principi della Dichiarazione di Helsinki. Tutti i pazienti hanno firmato un modulo dettagliato per il consenso informato riguardante la processazione e la pubblicazione dei loro dati. Hanno acconsentito “all’uso dei loro dati clinici ai fini della ricerca scientifica in campo biomedico ed epidemiologico, e ad essere richiamati in futuro per il follow-up, se fosse necessario”. I dati sono stati esaminati in accordo con le leggi italiane sulla privacy e la gestione dei dati sensibili, e in accordo con i regolamenti interni dell’Università di Padova.

Nello studio sono stati coinvolti 43 casi di carcinomi squamocellulari laringei sia in fase iniziale che in fase avanzata loco-regionalmente trattati con chirurgia primaria. Di questi 43 casi, 39 sono uomini (90.7%) e 4 donne (9.3%), di età media 65 ± 8.1 anni (età minima 49 anni, massima 82). Tutti i pazienti sono stati sottoposti alle seguenti indagini diagnostiche: microlaringoscopia con l’esecuzione di una biopsia laringea, endoscopia del tratto aero-digestivo superiore, ecografia del collo (con associata fine needle aspiration cytology se necessario), tomografia computerizzata con contrasto (ceCT) della testa e del collo, e/o risonanza magnetica (MRI) della testa e del collo, radiografia del torace ed ecografia all’addome.

I tumori erano localizzati in 7 casi (16.3%) nella sola regione sovraglottica, in 3

casi (6.9%) nella sola regione glottica, in 15 casi (34.9%) il tumore si estendeva alle regioni sovraglottica e glottica, nei restanti 18 casi (41.9%) l'estensione del tumore era transglottica.

L'istotipo in tutti i casi è quello di carcinoma squamocellulare; il grading assegnato era G1 in 7 casi (16.3%), G2 in 20 casi (46.5%), G3 nei restanti 16 casi (37.2%).

Al momento della diagnosi 11 casi (25.6%) presentavano metastasi linfonodali e in nessuno dei casi erano presenti metastasi a distanza al momento della diagnosi.

Tutti i pazienti sono stati trattati con chirurgia laringea nel dipartimento di Otorinolaringologia dell'Università di Padova: in 2 casi è stata eseguita una corpectomia in microlaringoscopia mediante laser CO_2 , in 23 casi sono state eseguite delle laringectomie orizzontali parziali (di queste 16 laringectomie sovracricoidi, 7 laringectomie sovraglottiche), in 18 casi sono state eseguite laringectomie totali. 41 casi sono stati anche sottoposti a svuotamento laterocervicale unilaterale o bilaterale.

L'analisi patologica ha stabilito che 21 casi (48.8%) venissero sottoposti a radioterapia adiuvante (con o senza la chemioterapia concomitante) in accordo con le attuali linee guida. Il follow up clinico alla fine del trattamento (adattato alle caratteristiche del singolo paziente) è stato programmato come segue:

- Una volta al mese per il primo anno;
- Una volta ogni due mesi per il secondo anno;
- Una volta ogni tre mesi per il terzo anno;
- Una volta ogni quattro mesi per il quarto anno;
- Una volta ogni sei mesi per il quinto anno;
- Una volta ogni 12 mesi a partire dal sesto anno.

Se clinicamente indicato, sono state ripetute le indagini radiologiche quali la ceCT o la MRI del collo, la PET-CT total body, la CT del torace, l'ecografia dell'addome. Il follow up medio è stato di 76.2 ± 46.5 mesi (la mediana di 80 mesi).

5.2 Valutazione istopatologica di TSR

Per ciascun paziente incluso nello studio, il parametro Tumor-stroma ratio è stato valutato sui vetrini colorati con ematossilina-eosina (HE) sia delle biopsie preoperatorie che dei corrispondenti campioni operatori, provenienti dall'archivio del Dipartimento di Anatomia Patologica. I campioni sono stati analizzati da due patologhe esperte in patologia oncologica del distretto testa-collo, che insieme hanno selezionato tutti i vetrini più rappresentativi.

Questi sono stati inizialmente valutati al microscopio ottico ad un ingrandimento complessivo di 40x, per identificare le aree che comprendessero la maggiore quantità di stroma. Nei vetrini relativi ai materiali operatori, è stato anche incluso il fronte di invasione della neoplasia.

Successivamente i vetrini più rappresentativi sono stati osservati ad un ingrandimento di 100x; sono stati esclusi tutti i campi in cui non fossero presenti sia il tumore che lo stroma, e in cui non fossero visualizzabili cellule tumorali su tutti i lati del campo analizzato.

Non sono state considerate parte dello stroma tutte le aree con presenza di necrosi, così come le strutture vascolari più grandi e le aree comprendenti tessuto muscolare. Non sono state escluse dal compartimento stromale le strutture vascolari più piccole, i nervi, le aree con infiltrato linfocitario.

Ai fini dell'analisi statistica, sia nelle biopsie preoperatorie che nei corrispondenti materiali operatori, i tumori sono stati classificati, come riportato da van Pelt et al. [41], in base alla proporzione di stroma presente in:

- Stroma-poor/TSR high, se era presente una proporzione di stroma $<50\%$;
- Stroma-rich/TSR low, se era presente una proporzione di stroma $\geq 50\%$.

5.3 Analisi immunoistochimica di MVD: CD31- e CD105-assessed MVD

Per l'esecuzione delle colorazioni immunoistochimiche, dai campioni provenienti dalle biopsie preoperatorie e dai corrispondenti materiali operatori (dopo fissazione in formalina ed inclusione in paraffina) sono state tagliate sezioni dello spessore di 2.5 μm . L'analisi immunoistochimica è stata eseguita con l'ausilio di un sistema automatizzato (Benchmark-Ultra, Ventana, Tucson, AZ, US) usando:

- Anticorpi per CD31 (Mouse Monoclonal, clone JC70A, dilution 1:50, Dako, Glostrup, Denmark);
- Anticorpi per CD105 (Mouse Monoclonal, clone SN6, dilution 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA).

Per calcolare la MVD è stato utilizzato il metodo sviluppato da Weidner et al. [51]. Dopo la colorazione immunoistochimica per CD31 e CD105, i vetrini sono stati esaminati al microscopio ottico con ingrandimento 100x per identificare le tre aree con il maggior numero di vasi sanguigni colorati. Queste aree sono definite "hot spots".

Nei vetrini provenienti dai materiali operatori sono state considerate sia le aree intra-tumorali che quelle peri-tumorali, queste ultime solo se entro 500 μm dal margine esterno del tumore.

Campioni bioptici di piccole dimensioni in cui non fossero chiaramente individuabili almeno tre "hot spots" sono stati esclusi dallo studio.

Una volta individuati gli "hot spots", i vasi sono stati contati con ingrandimento 400x (High Power Field-HPF, 0.237 mm^2/field under the light microscope). La MVD è stata definita come il numero medio di vasi presenti nei tre punti più vascolarizzati.

I microvasi, ai fini della misurazione della MVD, sono stati definiti come ogni struttura immunopositiva, sia che questa fosse una singola cellula endoteliale o un cluster di cellule, chiaramente distinta dai microvasi vicini, dalle cellule neoplasti-

che e da altri elementi del tessuto connettivo. I vasi con una tonaca muscolare sono stati esclusi dal conteggio, così come le aree con presenza di necrosi.

5.4 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita con SAS 9.4 per Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). I risultati sono stati riassunti tramite valori medi e deviazioni standard, mediane e intervalli interquartili per le variabili quantitative, conteggi e percentuali per le variabili categoriche. I dati raccolti sono stati interpretati utilizzando diversi tipi di analisi statistiche sottoelencate. La significatività statistica è per valori di $p < 0.05$, tranne nei casi in cui è specificato diversamente.

Gwet's AC1 statistics

Per valutare la concordanza fra il valore di TSR rilevato nelle biopsie preoperatorie e nei corrispondenti materiali operatori è stata usata la Gwet's AC1 statistic (la quale esprime la probabilità condizionale che due stime selezionate in modo randomizzato siano in accordo, presupponendo che l'accordo non sia mai presente per caso) e l'intervallo di confidenza (CI) al 95%. L'affidabilità prevede che le scale forniscano misure abbastanza simili se utilizzate da diversi valutatori (inter-rater reliability) o in più occasioni dallo stesso valutatore (intra-rater reliability). L'AC1 statistic ha la stessa interpretazione della Kappa statistic, e l'accordo è valutato secondo Altman [52] come:

- Scarso per valori < 0.20
- Discreto per valori fra $0.21 - 0.40$
- Moderato per valori fra $0.41 - 0.60$
- Buono per valori fra $0.61 - 0.80$
- Molto buono per valori ≥ 0.81 .

Lin's Concordance Correlation Coefficient CCC

La concordanza fra CD31-assessed MVD e CD105-assessed MVD nelle biopsie preoperatorie e nei corrispondenti materiali operatori è stata valutata utilizzando il Concordance Correlation Coefficient CCC e l'intervallo di confidenza al 95% è stato ottenuto tramite il metodo bootstrap (tecnica statistica che permette di stimare una determinata quantità in una popolazione a partire dalle stime medie di piccoli campioni di dati) con 2000 campionamenti. CCC è una misura di accuratezza e di precisione, di quanto le coppie si trovino in vicinanza della linea di 45 gradi. L'interpretazione dei risultati è analoga all'AC1 statistic.

Fisher's exact test e test di Mann-Whitney

L'associazione fra TSR nelle biopsie preoperatorie e materiali operatori con l'angiogenesi e le variabili clinico-patologiche convenzionali è stata valutata col Fisher's exact test nel caso di variabili categoriche (è usato nella statistica non parametrica in situazioni con due variabili nominali e dicotomiche e campioni piccoli) e col test di Mann-Whitney nel caso di variabili quantitative.

Cox's regression analysis

Il valore prognostico delle variabili clinico-patologiche convenzionali, del TSR e della MVD nelle biopsie preoperatorie e nei corrispondenti materiali operatori nel predire la disease free survival DSF, è stato valutato con l'analisi di regressione univariata tramite modello di Cox. I risultati della Cox's regression analysis sono stati espressi come P-values, Hazard Ratios e intervalli di confidenza al 95%.

La DFS è stata calcolata come l'intervallo di tempo a partire dal completamento della terapia fino alla recidiva della neoplasia o fino all'ultimo follow-up.

I potenziali predittori trovati essere statisticamente significativi con la regressione univariata, sono successivamente stati considerati in due modelli di regressione multivariata, il primo modello considerando i markers nelle biopsie preoperatorie e il secondo modello considerando i markers nei materiali operatori. L'assunzione

di proporzionalità del modello di Cox è stata controllata con il Kolmogorov-type supremum test facendo 1000 ricampionamenti.

Essendo CD31-assessed MDV e CD105-assessed MVD risultate collineari, per il calcolo della significatività statistica la CD31-assessed MVD è stata scartata.

Uno's concordance statistic

L'Uno's concordance statistic esprime la probabilità di concordanza [52]. Questa analisi è stata usata per valutare la capacità predittiva di ogni marker risultato statisticamente significativo nelle precedenti analisi univariate e multivariate. L'errore standard dell'Uno's concordance statistic è stato stimato con 100 perturbation-resampling, e l'intervallo di confidenza al 95% è stato calcolato considerando l'approssimazione normale.

Le Disease free survival predette dal TSR sia nelle biopsie preoperatorie che nei corrispondenti materiali operatori sono state rappresentate graficamente con le curve di Kaplan-Meier. Le curve si possono fare per TSR, essendo questo dicotomico, non per CD105-assessed MVD perché bisognerebbe prima categorizzare la variabile MVD secondo qualche criterio che non è ancora stato concordato, e scegliere il criterio in base al campione di questo studio non è fattibile non essendo la numerosità adeguata.

Capitolo 6

Risultati

Concordanza di TSR in biopsie preoperatorie e corrispondenti materiali operatori

La tabella in Figura (6.1) riporta i risultati della concordanza fra i valori di TSR nelle biopsie preoperatorie e nei corrispondenti materiali operatori. Il valore dell'analisi fatta secondo l'AC1 statistics di Gwet è di 0.7957 (CI al 95%: 0.6187 – 0.9727), ed essendo il valore ottenuto compreso fra 0.61 – 0.80 indica la presenza di un buon accordo fra le biopsie preoperatorie e i corrispondenti materiali operatori, secondo la scala di Altman Benchmark [53].

	TSR (materiali operatori)			
	TSR high/ Stroma poor (n. di casi = 29)	TSR high/ Stroma poor (n. di casi = 29)	Totale (n. di casi = 43)	AC1 statistic* (95% CI)
TSR (biopsie)				
TSR high/Stroma poor	27 (93.1%)	3 (21.4%)	30 (69.8%)	0.7957 (0.6187-0.9727)
TSR low/Stroma rich	2 (6.9%)	2 (6.9%)	13 (30.2%)	

Figura 6.1: Concordanza del TSR fra biopsie e materiali operatori: TSR: tumor-to-stroma ratio; 95% CI: intervallo di confidenza al 95%.

Concordanza di CD31-MVD e CD105-MVD in biopsie preoperatorie e corrispondenti materiali operatori, collinearità fra CD31-MVD e CD105-MVD

La tabella in Figura (6.2) riporta inizialmente i risultati della concordanza fra la MVD valutata con CD105 nelle biopsie preoperatorie e nei corrispondenti materiali operatori. Il valore del coefficiente di concordanza di Lin è di 0.7316 (CI al 95%: 0.5682 – 0.8382), indicante una buona concordanza. La stessa cosa si può dire per la concordanza fra la MVD valutata con CD31 nelle biopsie preoperatorie e nei corrispondenti materiali operatori, il valore di CCC in questo caso è di 0.6634 (CI al 95%: 0.5057 – 0.7078).

Essendoci collinearità fra la MVD valutata con CD31 e quella valutata con CD105, la significatività statistica nei risultati e nelle tabelle successive è stata valutata tenendo conto solo della CD105-assessed MVD.

	Biopsie	Materiali operatori	Biopsie – materiali operatori	CCC (95% CI)
MVD CD105				
Media (SD)	4.63 (5.98)	7.51 (8.38)	-2.88 (4.71)	0.7316 (0.5682-0.8382)
Mediana (IQR)	0.00 (0.00–10.34)	4.00 (0.00–15.67)	0.00 (-5.00–0.00)	
MVD CD31				
Media (SD)	7.07 (5.54)	10.96 (7.41)	-3.90 (4.30)	0.6634 (0.5057-0.7828)
Mediana (IQR)	5.34 (3.00–12.34)	7.00 (5.34–18.34)	-3.67 (-6.66– -0.67)	

Figura 6.2: Concordanza dei marcatori angiogenici fra biopsie preoperatorie e corrispondenti materiali operatori (n. di casi = 43); SD: deviazione standard; IQR: range inter quartile; CCC: concordance correlation coefficient; 95% CI: intervallo di confidenza al 95% (ottenuto con metodo bootstrap tramite duemila ricampionamenti).

Concordanza fra TSR e MVD, e concordanza fra TSR e variabili clinico-patologiche convenzionali

Nella tabella in Figura (6.3) sono inizialmente elencati i risultati della concordanza fra TSR e l'angiogenesi nelle biopsie preoperatorie e nei materiali operatori corrispondenti.

Nelle biopsie preoperatorie i casi TSR low/stroma rich sono associati a valori di CD105-assessed MVD più elevati (P value di 0.0380) (vedi in Figura (6.6) A B C e in Figura (6.7) A B). Dall'analisi dei materiali operatori risulta che la mediana di CD105-assessed e CD31-assessed MVD è significativamente maggiore nei casi TSR low/stroma rich (rispettivamente con P value di 0.0089 e 0.0391) (vedi in Figura (6.6) D E e Figura (6.7) C D).

Nella stessa tabella si nota come non siano state riscontrate associazioni significative fra TSR valutato nelle biopsie preoperatorie e le variabili clinico-patologiche convenzionali, né fra TSR valutato nei corrispondenti materiali operatori e le stesse variabili clinico-patologiche convenzionali.

Valore prognostico delle variabili clinico-patologiche convenzionali

La tabella in Figura (6.4) mostra i dettagli clinico-patologici, basati sull'ottava edizione della classificazione TNM dei tumori maligni [54]. Ventinove pazienti, il 67.4% del totale, non ha avuto recidive di malattie dopo il completamento del trattamento, mentre quattordici pazienti, il 32.6%, hanno avuto recidive dopo una mediana di 11 mesi, il range andava dai 4 mesi ai 24 mesi dopo il termine del trattamento.

L'analisi di regressione univariata tramite modello di Cox non ha trovato che i parametri pT, grading, e stadiazione patologica fossero predittivi della Disease Free Survival.

L'N status è risultato predittivo di DFS con un trend tendente alla significatività statistica, essendo risultato $p=0.07$.

Valore prognostico di TSR e MDV e concordanza fra biopsie preoperatorie e materiali operatori

La tabella in Figura (6.8) mostra come, secondo l'analisi di regressione univariata tramite modello di Cox, TSR è associato alla DFS sia nelle biopsie preoperatorie che nei corrispondenti materiali operatori.

	TSR (biopsie)				TSR (materiali operatori)			
	TSR high/ Stroma poor (n. di casi = 30)	TSR low/ Stroma rich (n. di casi = 13)	Totale (n. di casi = 43)	P Value*	TSR high/ Stroma poor (n. di casi = 29)	TSR high/ Stroma poor (n. di casi = 29)	Totale (n. di casi = 43)	P Value*
MVD CD105 (biopsie)								
Media (SD)	3.30 (5.45)	7.69 (6.21)	4.63 (5.98)	0.0380	-	-	-	-
Mediana (IQR)	0.00 (0.00 – 4.00)	8.00 (0.00 – 12.67)	0.00 (0.00 – 10.34)		-	-	-	
MVD CD31 (biopsie)								
Media (SD)	5.94 (4.98)	9.67 (6.07)	7.07 (5.54)	0.0953	-	-	-	-
Mediana (IQR)	4.17 (3.00 – 6.34)	12.00 (5.67 – 15.34)	5.34 (3.00 – 12.34)		-	-	-	
MVD CD105 (materiali operatori)								
Media (SD)	5.22 (7.00)	12.80 (9.17)	7.51 (8.38)	0.0089	5.10 (7.22)	12.50 (8.66)	7.51 (8.38)	0.0089
Mediana (IQR)	0.00 (0.00 – 9.67)	16.67 (3.00 – 20.00)	4.00 (0.00 – 15.67)		0.00 (0.00 – 7.67)	15.34 (3.00 – 20.00)	4.00 (0.00 – 15.67)	
MVD CD31 (materiali operatori)								
Media (SD)	9.15 (6.46)	15.16 (8.02)	10.96 (7.41)	0.0253	9.12 (6.37)	14.79 (8.17)	10.96 (7.41)	0.0391
Mediana (IQR)	6.67 (5.34 – 12.67)	18.34 (8.00 – 22.00)	7.00 (5.34 – 18.34)		6.67 (5.34 – 9.67)	16.17 (8.00 – 22.34)	7.00 (5.34 – 18.34)	
pT stage								
T1+T2	16 (53.3%)	3 (23.1%)	19 (44.2%)	0.0977	14 (48.3%)	5 (35.7%)	19 (44.2%)	0.5229
T3+T4	14 (46.7%)	10 (76.9%)	24 (55.8%)		15 (51.7%)	9 (64.3%)	24 (55.8%)	
N status								
N0 (30 pN0+ 2 cN0)	22 (73.3%)	10 (76.9%)	32 (74.4%)	1.0000	21 (72.4%)	11 (78.6%)	32 (74.4%)	1.0000

Figura 6.3: Associazione fra TSR, espressione dei marker angiogenetici e variabili clinico-patologiche nelle biopsie preoperatorie e nei materiali operatori. Fisher's exact test per variabili categoriche; Mann-Whitney test per variabili quantitative TSR: tumor stroma ratio; MVD: densità microvascolare.

	Recidiva			
n. di casi = 43	No (n. di casi = 29)	Sì (n. di casi = 14)	P Value	HR (95% CI)
Età				
Media (SD)	63.48 (8.69)	68.29 (6.29)	0.0772	1.061 (0.994-1.134)
Mediana (IQR)	64.00 (60.00–68.00)	68.00 (64.00–72.00)		
pT stage				
T1	6 (20.7%)	1 (7.1%)		
T2	9 (31.0%)	3 (21.4%)		
T3	8 (27.6%)	9 (64.3%)		
T4	6 (20.7%)	1 (7.1%)		
pT stage (binario)				
T1+T2	15 (51.7%)	4 (28.6%)	0.1869	1 2.185 (0.684-6.977)
T3+T4	14 (48.3%)	10 (71.4%)		
Grade				
G1	5 (17.2%)	2 (14.3%)		
G2	16 (55.2%)	4 (28.6%)		
G3	8 (27.6%)	8 (57.1%)		
Grade (binario)				
G1	5 (17.2%)	2 (14.3%)	0.7986	1 1.215 (0.272-5.440)
G2+G3	24 (82.8%)	12 (85.7%)		
N status				
N0	24 (82.8%)	8 (57.1%)	0.0736	1 2.642 (0.911-7.657)
N+	5 (17.2%)	6 (42.9%)		
Stadiazione Patologica				
	6 (20.7%)	1 (7.1%)		
II	7 (24.1%)	3 (21.4%)		
III	8 (27.6%)	4 (28.6%)		
IV	8 (27.6%)	6 (42.9%)		
Stadiazione Patologica (binario)				
I+II	13 (44.8%)	4 (28.6%)	0.3525	1 1.734 (0.543-5.533)
III+IV	16 (55.2%)	10 (71.4%)		

Figura 6.4: Valore prognostico delle variabili clinico-patologiche (analisi di regressione univariata di Cox).

Nelle biopsie preoperatorie in Figura (6.5 A) il valore di p è 0.003, Uno's concordance di 0.75, intervallo di confidenza al 95% 0.64-0.87; nei materiali operatori in Figura (6.5 B) il valore di p è 0.002, Uno's concordance di 0.77, CI al 95% 0.56-0.98. I casi TSR low/stroma rich sono associati a una ridotta DFS.

La DFS è associata alla CD105-assessed MVD e alla CD31-assessed MVD sia nelle biopsie preoperatorie (per CD105-assessed MVD: $p < 0.0001$, Uno's concordance 0.84, CI al 95% 0.76-0.92; per CD31-assessed MVD $p < 0.0001$, Uno's concordance 0.82, CI al 95% 0.71-0.93), sia nei corrispondenti materiali operatori (CD105-assessed MVD: $p < 0.0001$, Uno's concordance 0.88, CI al 95% di 0.81-0.95; CD31-assessed MVD: $p < 0.0001$, Uno's concordance 0.84, CI al 95% di 0.74-0.95).

Essendoci collinearità fra la CD105-assessed MVD e la CD31-assessed MVD sia nelle biopsie preoperatorie che nei corrispondenti materiali operatori, è stata scelta la CD105-assessed MVD per l'analisi multivariata, essendo CD105 più specifica per la neoangiogenesi [19][29][32].

Considerando le biopsie preoperatorie, dalla regressione multivariata di Cox (6.8) risulta che sia TSR ($p = 0.0032$; HR=6.112, intervallo di confidenza al 95% di 1.833-20.378), che la CD105-assessed MVD ($p = 0.0002$; HR=1.201 e intervallo di confidenza al 95% di 1.090-1.322) sono predittori indipendenti della DFS al termine del trattamento primario della neoplasia laringea. Analogamente, nei corrispondenti materiali operatori, dalla regressione multivariata di Cox risulta che sia TSR ($p = 0.0074$; HR=6.137, intervallo di confidenza al 95% di 1.626-23.172) che la CD105-assessed MVD ($p = 0.0005$; HR=1.172, e intervallo di confidenza al 95% di 1.071-1.282) mantengono la loro significatività statistica come predittori della DFS.

Dall'Uno's concordance statistic risulta 0.90 (intervallo di confidenza al 95%: 0.84-0.97) per il modello (di TSR e CD105-assessed MVD) nelle biopsie preoperatorie, e risulta 0.91 (intervallo di confidenza al 95%: 0.82-1.00) nei corrispondenti materiali operatori.

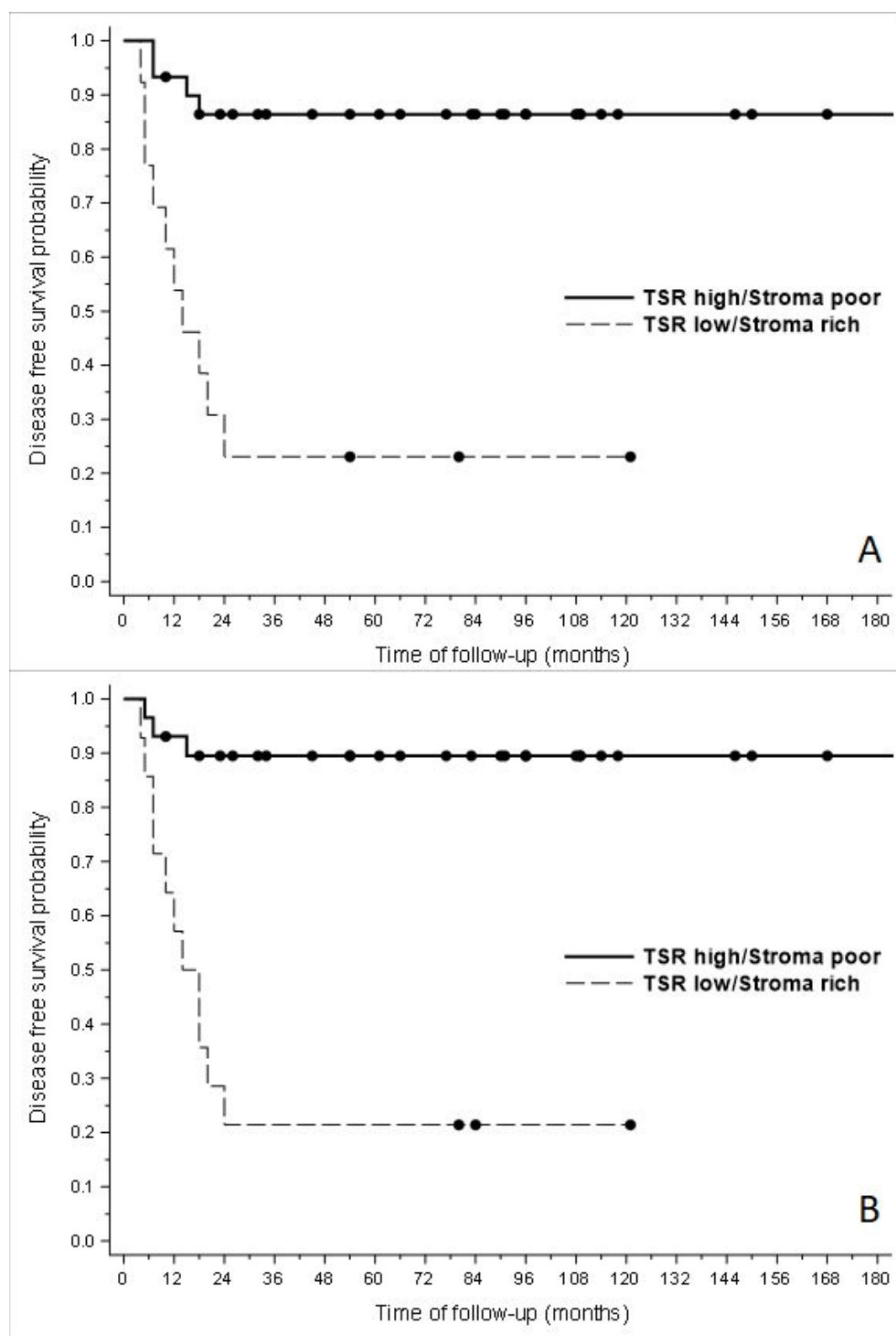


Figura 6.5: A. Disease free survival per TSR valutata in biopsie preoperatorie di LSCC; B. Disease free survival per TSR valutata nei materiali operatori di LSCC.

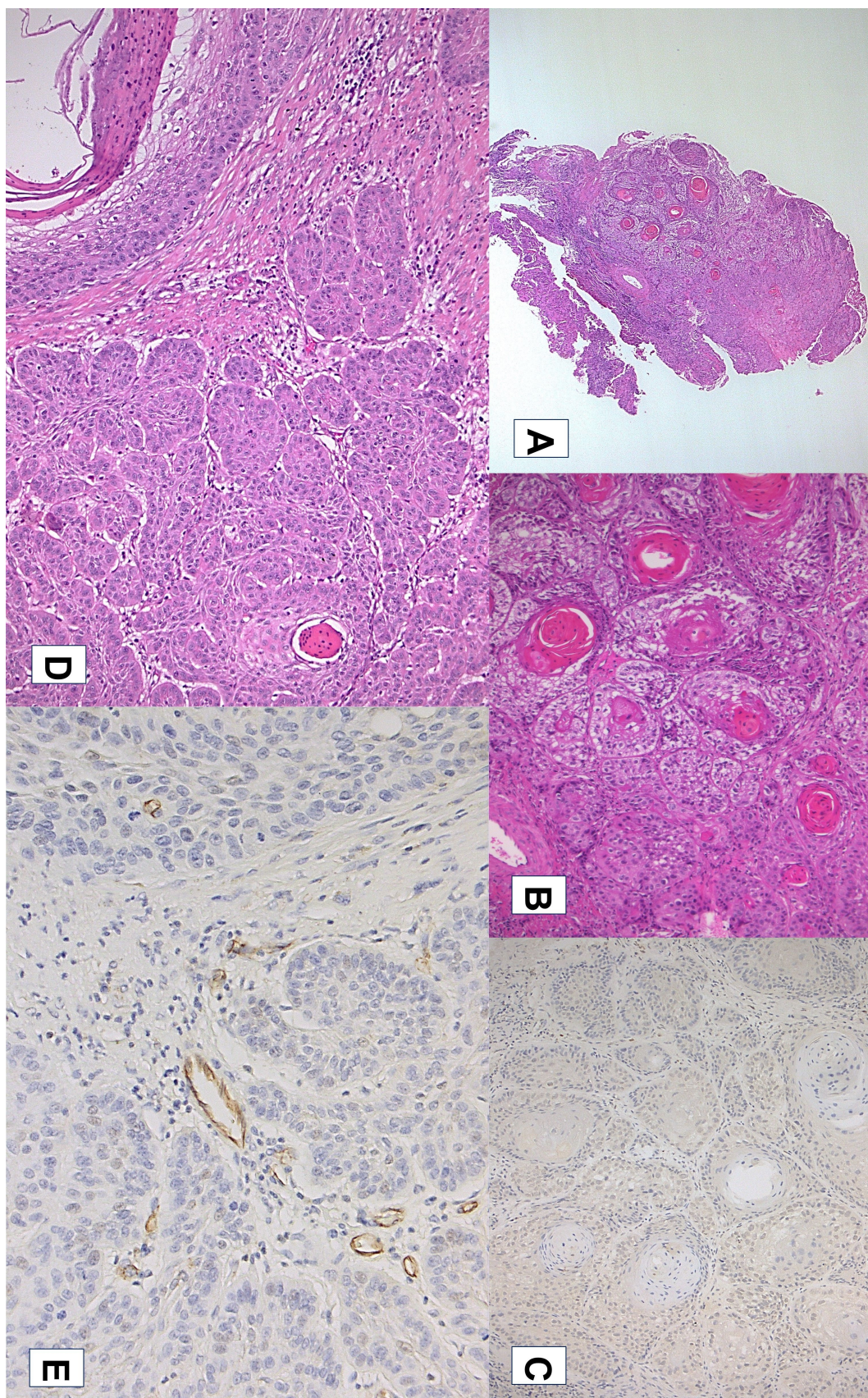


Figura 6.6: Descrizione a seguire.

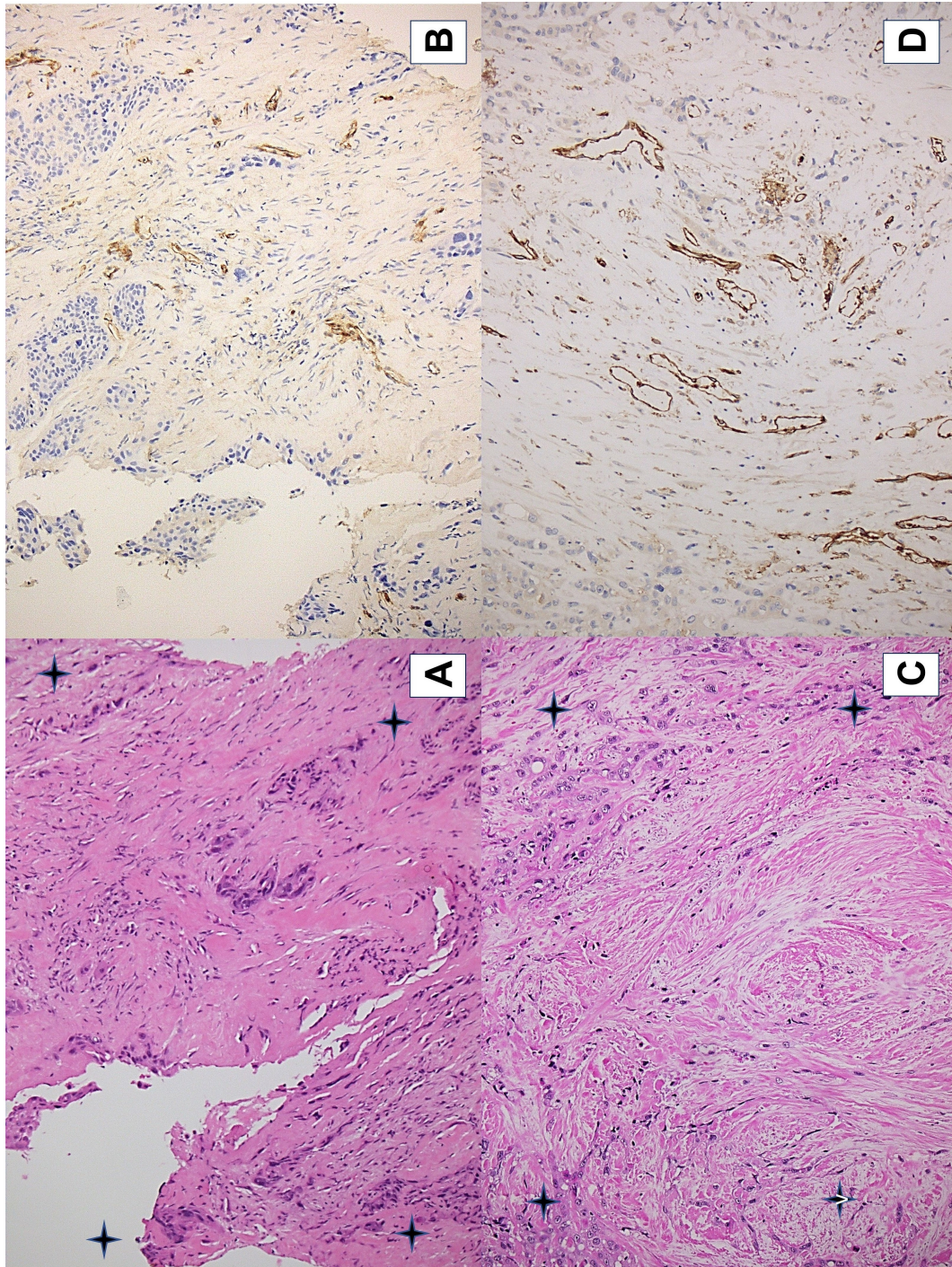


Figura 6.7: Descrizione a seguire.

Descrizione immagini

Figura 6.6: A. Piccolo campione biotico preoperatorio di un caso di LSCC TSR high/stroma-poor (ematossilina ed eosina, ingrandimento originale 25x); B. Stesso caso di A, ad ingrandimento superiore, in cui si evidenzia lo scarso contenuto di stroma fra i nidi di cellule neoplastiche (ematossilina ed eosina, ingrandimento originale 100x); C. Immunoistochimica per CD105 mostra l'assenza di microvasi nello stroma tumorale (ingrandimento originale 100x); D. Corrispondente materiale operatorio conferma la concordanza di TSR con la biopsia preoperatoria (ingrandimento originale 100x); E. Immunoistochimica per CD31 (non presente quella per CD105) mostra una bassa MVD nel corrispondente materiale operatorio (ingrandimento originale 200x).

Figura 6.7: A. Frammento di biopsia preoperatoria di un caso di LSCC TSR low/stroma-rich, piccole corde di tumore e single cellule neoplastiche isolate su tutti i lati del campo (stelle) come da raccomandazioni (vedi capitolo 5) (ematossilina ed eosina); B. Immunoistochimica per CD105 mostra un'elevata MVD; C. Corrispondente materiale operatorio conferma la concordanza di TSR con la biopsia preoperatoria (cellule neoplastiche su tutti i lati del campo analizzato, evidenziate con delle stelle); D. L'immunoistochimica per CD105 nel materiale operatorio evidenzia una elevata MVD. A, B, C, D: (ingrandimento originale 100x).

	Recidiva			
n. di casi = 43	No (n. di casi = 29)	Si (n. di casi = 14)	P Value	HR (95% CI)
TSR (biopsie)				
TSR high/ Stroma poor	26 (89.7%)	4 (28.6%)	0.0003	8.808 (2.739-28.323)
TSR low/ Stroma rich	3 (10.3%)	10 (71.4%)		
MVD CD105 (biopsie)				
Media (SD)	1.56 (3.57)	10.98 (4.86)	<0.0001	1.215 (1.112-1.327)
Mediana (IQR)	0.00 (0.00–2.34)	11.84 (8.00–15.00)		
MVD CD31 (biopsie)				
Media (SD)	4.51 (3.90)	12.36 (4.65)	<0.0001	1.197 (1.101-1.301)
Mediana (IQR)	3.34 (2.34–5.34)	13.84 (8.67–15.67)		
TSR (materiali operatori)				
TSR high/ Stroma poor	26 (89.7%)	3 (21.4%)	0.0002	11.207 (3.093-40.611)
TSR low/ Stroma rich	3 (10.3%)	11 (78.6%)		
MVD CD105 (materiali operatori)				
Media (SD)	3.27 (5.81)	16.31 (5.53)	<0.0001	1.192 (1.100-1.291)
Mediana (IQR)	0.00 (0.00–4.34)	16.84 (15.00–20.00)		
MVD CD31 (materiali operatori)				
Media (SD)	7.58 (5.50)	17.98 (5.82)	<0.0001	1.150 (1.079-1.226)
Mediana (IQR)	6.67 (5.34–7.67)	18.67 (14.00–22.34)		

Figura 6.8: Valore prognostico di TSR e MVD (analisi di regressione univariata di Cox).

Capitolo 7

Discussione

Negli ultimi vent'anni, il ruolo del microambiente tumorale nella progressione delle neoplasie maligne e la sua influenza sulla prognosi sono risultati sempre più evidenti [55]. Le interazioni fra le cellule tumorali e i componenti dello stroma e l'equilibrio che si instaura sono critiche per la progressione del tumore, di conseguenza hanno un significato prognostico determinante e implicazioni terapeutiche [17]. Una delle interazioni fra cellule tumorali e stromali più importante è l'angiogenesi, processo nel quale la comunicazione fra cellule neoplastiche e cellule endoteliali risulta nella produzione in situ e nella secrezione nel microambiente tumorale di numerose citochine e fattori di crescita, fra cui molti fattori pro-angiogenici [56].

Nonostante i fibroblasti siano stati considerati a lungo degli spettatori passivi, è stato riconosciuto il loro ruolo attivo nel supporto della progressione tumorale, indirizzando l'attenzione verso lo studio dei pattern di interazione fra tumore e stroma per capire meglio il comportamento biologico del cancro [43][57]. Recentemente Kang et al. [25] hanno dimostrato che il cancro del colon-retto TSR high/stroma poor è significativamente associato ad una più lunga sopravvivenza libera da recidive e a una migliore sopravvivenza in generale. In questo studio preliminare, così come riportato da Kang et al. [25], un cut-off del 50% è stato ritenuto appropriato per distinguere i livelli di stroma al fine di predire la prognosi dei pazienti con LSCC. Essendoci un'associazione significativa fra la condizione stroma high/TSR low e un'elevata espressione dei marker angiogenetici, si può supporre che l'at-

tivazione e la differenziazione del mesenchima peritumorale possano comportare una serie di cambiamenti nello stroma, fra i quali l'attivazione della neoangiogenesi e della reazione desmoplastica, che pare supportino la progressione del LSCC [26][43][57].

I Cancer Associated Fibroblasts (CAFs), i componenti predominanti dello stroma tumorale, favoriscono la tumorigenesi, l'angiogenesi e la diffusione di metastasi attraverso la secrezione di fattori di crescita e di citochine, e promuovendo il rimodellamento del microambiente tumorale e della vascolatura. Fra i fattori secreti il più rilevante è probabilmente VEGF, il quale promuove la migrazione e la proliferazione delle cellule endoteliali e aumenta la permeabilità vascolare [58]. È importante anche CXCL12, una chemochina che promuove l'angiogenesi tramite il reclutamento nel microambiente tumorale delle cellule endoteliali progenitrici [59]. In due modelli preclinici sulla progressione tumorale, si è visto che i CAFs che esprimono CD105 promuovono l'invasione delle cellule tumorali e la metastatizzazione [19].

Questo studio è stato il primo ad esaminare il ruolo prognostico di TSR e di CD31- e CD105-assessed MVD sia nelle biopsie preoperatorie che nei corrispondenti materiali operatori, e le associazioni fra i diversi marker. La forza dello studio risiede principalmente nell'omogeneità della popolazione oggetto dello studio. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad intervento chirurgico primario, tutti gli interventi sono stati eseguiti dalla stessa equipe e sono stati definiti dei criteri clinico-radiologici per il follow-up. Nello studio sono stati considerati solo casi di neoplasie primarie della laringe, e solo casi di carcinoma squamocellulare. Per ogni caso sono state valutate e comparate sia le biopsie preoperatorie che i materiali operatori corrispondenti, e per analizzare le variabili potenzialmente predittive della DFS è stato usato un modello multivariato di analisi statistica. Per la valutazione dell'angiogenesi nel LSCC, sia CD105 che CD31 sono stati utilizzati per la valutazione della MVD, CD31-assessed MVD è molto utilizzato e ha un'ottima standardizzazione. Inoltre, le patologhe del gruppo di ricerca hanno più di 15 anni [60] di esperienza nella valutazione della densità microvascolare con tecniche immunohistochimiche nell'ambito dei tumori della testa e del collo, anche in associazione con oncosoppressori [48] e oncogeni [49]. I punti deboli dello studio consistono

nella natura retrospettiva dello studio e nel limitato numero di casi analizzati.

Recentemente Kang et al. [25] hanno dimostrato che HIF-1 α era più espresso dalle cellule tumorali nel sottogruppo stroma high/TSR low, inoltre MVD era più elevata nel sottogruppo stroma high rispetto al sottogruppo stroma low. In studi precedenti, il gruppo del Professor Marioni ha misurato l'espressione di HIF-1 α e di CD105 in una serie di casi di LSCC: all'analisi multivariata l'espressione di CD105 era risultata indipendentemente prognostica per la DFS, mentre l'espressione di HIF-1 α non lo era [61].

I risultati dell'attuale studio mostrano come la condizione TSR low/stroma rich sia associata ad una MVD più elevata sia nelle biopsie preoperatorie che nei corrispondenti materiali operatori provenienti da casi di carcinomi squamocellulari laringei (vedi tabella in Figura 6.3). Secondo l'analisi di regressione univariata di Cox, la DFS è associata a TSR sia nelle biopsie preoperatorie che nei materiali operatori; lo stesso si può dire per la CD31- e CD105-assessed MVD (vedi tabella in Figura 6.8). Inoltre, considerando sia biopsie che materiali operatori, l'analisi multivariata ha trovato che sia TSR che CD105-assessed MVD predicono la DFS post trattamento primario, e l'Uno's concordance statistic dà risultati maggiori rispetto a quelli relativi ad ogni singolo predittore. Nonostante alcune limitazioni intrinseche delle biopsie preoperatorie (fra le quali il fatto che non sono necessariamente rappresentative dell'intera neoplasia, o la possibilità che possano essere affette da artefatti dovuti alle ridotte dimensioni e alla procedura stessa, oppure dal fatto che le metodiche immunoistochimiche possono non essere accurate in campioni biotipici piccoli), i risultati di questo studio sono potenzialmente rilevanti in ambito clinico. Per quanto riguarda altre tipologie di neoplasie, l'evidenza scientifica attuale sembra indicare che le biopsie preoperatorie siano valide ai fini della valutazione dei biomarker [62][63]. Per il LSCC sono necessari ulteriori studi, prospettici e su popolazioni più ampie, prima di poter considerare TSR e CD105-assessed MVD (anche valutati sulle biopsie pre-trattamento) come markers decisionali che possano portare il team multidisciplinare ad intensificare in qualche modo il trattamento (ad esempio con un protocollo trimodale invece che bimodale) e/o ad accorciare gli intervalli di tempo del follow up nei pazienti che risultino avere un tumore

più avanzato e più aggressivo. È importante tenere in considerazione che, insieme ai tradizionali schemi terapeutici che prevedono la combinazione di più opzioni di trattamento, la terapia anti-angiogenetica è una delle strategie più promettenti nell'ambito della targeted therapy [18][19][32][35]. Inibendo CD105 si dovrebbe essere in grado di ostacolare il signalling di $TGF\beta$, potenzialmente questo potrebbe bloccare una pathway alternativa causa di resistenza alla terapia con inibitori di VEGF [64]. Dei trial clinici hanno recentemente testato un anticorpo monoclonale chimerico IgG1 anti-CD105 (TRC105) che si lega all'endogлина umana con elevata avidità, indicando che CD105 potrebbe essere un target promettente per la terapia anti-angiogenetica [65]. TCR105 inibisce l'angiogenesi e la crescita tumorale tramite l'inibizione della crescita delle cellule endoteliali, la citotossicità anticorpo-mediata, l'inibizione della trasduzione della pathway di signalling intracellulare e/o inducendo la trasduzione di signalling aberranti, inducendo l'apoptosi, con azione complementare agli inibitori di VEGF [29]. Inoltre, la terapia antiCD105 ha dimostrato di essere in grado di diminuire il processo di disseminazione metastatica e di ridurre il contenuto di CAFs nei tumori primari [19].

Capitolo 8

Conclusioni

Questo studio esplorativo ha mostrato come TSR e CD105-assessed MVD valutati nelle biopsie laringee pretrattamento e nei corrispettivi tumori radicalmente rimossi chirurgicamente fossero mutualmente correlate, implicando che probabilmente esiste un background molecolare comune, e ha dimostrato come entrambi i marker abbiano un effetto prognostico indipendente. Se confermato da studi prospettici su più larga scala, TSR e CD105-assessed MVD potrebbero venire proposti come biomarker prognostici per il carcinoma squamocellulare laringeo. Oltre che come predittori prognostici, questi marker potrebbero essere valutati come fattori rilevanti nella scelta dell'intensificazione del trattamento o per l'utilizzo di targeted therapy nel prossimo futuro.

Bibliografia

- [1] M. Anniko, M. Bernal-Sprekelsen, Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Springer Berlin, Heidelberg. 2010: 461-502, 538-567, 613-652, 677-684, 707-710.
- [2] Anastasi G. TRATTATO DI ANATOMIA UMANA - Volume secondo di Autori vari. In: 2010: 241-256.
- [3] <http://www.math.unife.it/medicina/logopedia/minisiti/scienze-mediche-e-chirurgiche/foniatria/foniatria-sc-med-chir-2deg-1deg-2018-19.pdf>
- [4] Netter Frank H., Netter, Atlante di anatomia umana - sesta edizione, EDRA. 2014: T64, T79-80.
- [5] Becker M, Monnier Y, de Vito C. MR Imaging of Laryngeal and Hypopharyngeal Cancer. Magn Reson Imaging Clin N Am. 2022 Feb;30(1):53-72.
- [6] Kolator M, Kolator P, Zatoński T. Assessment of quality of life in patients with laryngeal cancer: A review of articles. Adv Clin Exp Med. 2018 May;27(5):711-715.
- [7] Machiels JP, René Leemans C, Golusinski W, Grau C, Licitra L, Gregoire V; EHNS Executive Board. Electronic address: secretariat@ehns.org; ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org; ESTRO Executive Board. Electronic address: info@estro.org. Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2020 Nov;31(11):1462-1475.
- [8] <https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/tumori-faringe-laringe>
- [9] <https://www.aiom.it/linee-guida-aiom-2021-tumori-della-testa-e-del-collo>
- [10] Lovato A, Marioni G, Manzato E, Staffieri C, Giacomelli L, Ralli G, Staffieri A, Blandamura S. Elderly patients at higher risk of laryngeal carcinoma recurrence could be identified by a panel of two biomarkers (nm23-H1 and CD105) and pN+ status. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2015 Nov;272(11):3417-3424.

- [11] Nocini R, Molteni G, Mattiuzzi C, Lippi G. Updates on larynx cancer epidemiology. *Chin J Cancer Res.* 2020 Feb;32(1):18-25.
- [12] Ferlito A, Devaney KO, Hunt JL, Hellquist H. Some Considerations on the WHO Histological Classification of Laryngeal Neoplasms. *Adv Ther.* 2019 Jul;36(7):1511-1517.
- [13] Machiels JP, René Leemans C, Golusinski W, Grau C, Licitra L, Gregoire V; EHNS Executive Board, ESMO Guidelines Committee, ESTRO Executive Board. Reprint of "Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up". *Oral Oncol.* 2021 Feb;113:105042.
- [14] Marioni G, Giacomelli L, D'Alessandro E, Staffieri C, Guzzardo V, Staffieri A, Blandamura S. Laryngeal carcinoma recurrence rate and disease-free interval are related to CD105 expression but not to vascular endothelial growth factor 2 (Flk-1/Kdr) expression. *Anticancer Res.* 2008 Jan-Feb;28(1B):551-557.
- [15] Almangush A, Mäkitie AA, Triantafyllou A, de Bree R, Strojjan P, Rinaldo A, Hernandez-Prera JC, Suárez C, Kowalski LP, Ferlito A, Leivo I. Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: An update. *Oral Oncol.* 2020 Aug;107:104799.
- [16] Almangush A, Alabi RO, Troiano G, Coletta RD, Salo T, Pirinen M, Mäkitie AA, Leivo I. Clinical significance of tumor-stroma ratio in head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer.* 2021 Apr 30;21(1):480.
- [17] Valkenburg KC, de Groot AE, Pienta KJ. Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018 Jun;15(6):366-381.
- [18] Ollauri-Ibáñez C, Ayuso-Íñigo B, Pericacho M. Hot and Cold Tumors: Is Endoglin (CD105) a Potential Target for Vessel Normalization? *Cancers (Basel).* 2021 Mar 28;13(7):1552.
- [19] González Muñoz T, Amaral AT, Puerto-Camacho P, Peinado H, de Álava E. Endoglin in the Spotlight to Treat Cancer. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 20;22(6):3186.
- [20] Schoonderwoerd MJA, Goumans MTH, Hawinkels LJAC. Endoglin: Beyond the Endothelium. *Biomolecules.* 2020 Feb 12;10(2):289.
- [21] Hou Y, Yang X, Miao S, Qu G, Meng H. Interactive regulation of laryngeal cancer and neuroscience. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2021 Aug;1876(1):188580.
- [22] De Palma M, Biziato D, Petrova TV. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2017 Aug;17(8):457-474.

- [23] Hinshaw DC, Shevde LA. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res.* 2019 Sep 15;79(18):4557-4566.
- [24] Rani P, Gupta AJ, Mehrol C, Singh M, Khurana N, Passey JC. Clinicopathological correlation of tumor-stroma ratio and inflammatory cell infiltrate with tumor grade and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of buccal mucosa and tongue in 41 cases with review of literature. *J Cancer Res Ther.* 2020 Apr-Jun;16(3):445-451.
- [25] Kang G, Pyo JS, Kim NY, Kang DW. Clinicopathological Significances of Tumor-Stroma Ratio (TSR) in Colorectal Cancers: Prognostic Implication of TSR Compared to Hypoxia-Inducible Factor-1 α Expression and Microvessel Density. *Curr Oncol.* 2021 Mar 22;28(2):1314-1324.
- [26] Karpathiou G, Vieville M, Gavid M, Camy F, Dumollard JM, Magné N, Froudarakis M, Prades JM, Peoc'h M. Prognostic significance of tumor budding, tumor-stroma ratio, cell nests size, and stroma type in laryngeal and pharyngeal squamous cell carcinomas. *Head Neck.* 2019 Jun;41(6):1918-1927.
- [27] Hasan J, Byers R, Jayson GC. Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours. *Br J Cancer.* 2002 May 20;86(10):1566-1577.
- [28] Lionello M, Staffieri A, Marioni G. Potential prognostic and therapeutic role for angiogenesis markers in laryngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol.* 2012 Jun;132(6):574-582.
- [29] Marioni G, Franz L, Ottaviano G, Contro G, Tealdo G, Carli A, Frigo AC, Nicolai P, Alessandrini L. Prognostic Significance of CD105- and CD31-Assessed Microvessel Density in Paired Biopsies and Surgical Samples of Laryngeal Carcinoma. *Cancers (Basel).* 2020 Jul 25;12(8):2059.
- [30] Franz L, Nicolè L, Frigo AC, Ottaviano G, Gaudioso P, Saccardo T, Visconti F, Cappellesso R, Blandamura S, Fassina A, Marioni G. Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Neoangiogenesis in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel).* 2021 Jul 3;13(13):3339.
- [31] Franz L, Alessandrini L, Saccardo T, Frigo AC, Marioni G. CD105- and CD31-assessed microvessel density in laryngeal carcinoma biopsies as a predictor of recurrence after exclusive primary surgery. *Ann Diagn Pathol.* 2020 Oct;48:151608.
- [32] Marioni G, D'Alessandro E, Giacomelli L, Staffieri A. CD105 is a marker of tumour vasculature and a potential target for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2010 May;39(5):361-367.
- [33] Hu M, Zhang H, Liu Q, Hao Q. Structural Basis for Human PECAM-1-Mediated Trans-homophilic Cell Adhesion. *Sci Rep.* 2016 Dec 13;6:38655.

- [34] Kim SW, Kim H, Yoon YS. Advances in bone marrow-derived cell therapy: CD31-expressing cells as next generation cardiovascular cell therapy. *Regen Med.* 2011 May;6(3):335-349.
- [35] Liu D, Kumar S, Ashworth J, Ali K, Fadel A, Guo B, Slevin M. CD105 (Endoglin): A Potential Anticancer Therapeutic Inhibits Mitogenesis and Map Kinase Pathway Activation. *Anticancer Res.* 2021 Mar;41(3):1219-1229.
- [36] Li L, Zhong L, Tang C, Gan L, Mo T, Na J, He J, Huang Y. CD105: tumor diagnosis, prognostic marker and future tumor therapeutic target. *Clin Transl Oncol.* 2022 Feb 15.
- [37] Marioni G, Blandamura S, Loreggian L, Koussis H, Lionello M, Giacomelli L, Fasanaro E, Lovato A, Staffieri A. Laryngeal carcinoma prognosis after postoperative radiotherapy correlates with CD105 expression, but not with angiogenin or EGFR expression. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2011 Dec;268(12):1779-87.
- [38] Mermod M, Bongiovanni M, Petrova T, Goun E, Simon C, Tolstonog G, Monnier Y. Prediction of Occult Lymph Node Metastasis in Head and Neck Cancer with CD31 Vessel Quantification. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2019 Feb;160(2):277-283.
- [39] Xu R, Won JY, Kim CH, Kim DE, Yim H. Roles of the Phosphorylation of Transcriptional Factors in Epithelial-Mesenchymal Transition. *J Oncol.* 2019 Jun 2;2019:5810465.
- [40] Wu J, Liang C, Chen M, Su W. Association between tumor-stroma ratio and prognosis in solid tumor patients: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2016 Oct 18;7(42):68954-68965.
- [41] van Pelt GW, Kjær-Frifeldt S, van Krieken JHJM, Al Dieri R, Morreau H, Tollenaar RAEM, Sørensen FB, Mesker WE. Scoring the tumor-stroma ratio in colon cancer: procedure and recommendations. *Virchows Arch.* 2018 Oct;473(4):405-412.
- [42] Karpathiou G, Gavid M, Prevot-Bitot N, Dhomps A, Dumollard JM, Vieville M, Lelonge Y, Prades JM, Froudarakis M, Peoc'h M. Correlation Between Semiquantitative Metabolic Parameters After PET/CT and Histologic Prognostic Factors in Laryngeal and Pharyngeal Carcinoma. *Head Neck Pathol.* 2020 Sep;14(3):724-732.
- [43] Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2010 Feb;21(1):33-39.
- [44] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-674.

- [45] Marioni G, Marino F, Blandamura S, D'Alessandro E, Giacomelli L, Guzzardo V, Lionello M, De Filippis C, Staffieri A. Neoangiogenesis in laryngeal carcinoma: angiogenin and CD105 expression is related to carcinoma recurrence rate and disease-free survival. *Histopathology*. 2010 Oct;57(4):535-543.
- [46] Tanaka F, Ishikawa S, Yanagihara K, Miyahara R, Kawano Y, Li M, Otake Y, Wada H. Expression of angiopoietins and its clinical significance in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2002 Dec 1;62(23):7124-7129.
- [47] Marioni G, Nucci R, Marino F, Giacomelli L, Rugge M, Pareschi R, Martini A. Neoangiogenesis in temporal bone carcinoma: the prognostic role of CD105. *Otol Neurotol*. 2012 Jul;33(5):843-848.
- [48] Marioni G, D'Alessandro E, Giacomelli L, De Filippis C, Calgaro N, Sari M, Staffieri A, Blandamura S. Maspin nuclear localization is related to reduced density of tumour-associated micro-vessels in laryngeal
- [49] Marioni G, Ottaviano G, Marchese-Ragona R, Fasanaro E, Tealdo G, Zanotti C, Randon B, Giacomelli L, Stellini E, Blandamura S. Nuclear survivin expression correlates with endoglin-assessed microvascularisation in laryngeal carcinoma. *J Clin Pathol*. 2017 Dec;70(12):1033-1037.
- [50] Franz L, Tealdo G, Contro G, Bandolin L, Carraro V, Giacomelli L, Alessandrini L, Blandamura S, Marioni G. Biological tumor markers (maspin, CD105, nm23-H1) and disease relapse in laryngeal cancer: cluster analysis. *Head Neck*. 2020 Aug;42(8):2129-2136.
- [51] Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991 Jan 3;324(1):1-8.
- [52] Uno H, Cai T, Pencina MJ, D'Agostino RB, Wei LJ. On the C-statistics for evaluating overall adequacy of risk prediction procedures with censored survival data. *Stat Med*. 2011 May 10;30(10):1105-1117.
- [53] Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research*. Chapman and Hall; 1991.
- [54] Amin MB. *AJCC Staging Manual*, 8th ed.; Springer: Basel, Switzerland, 2017
- [55] De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol*. 2003 Jul;200(4):429-447.
- [56] Chan MS, Wang L, Chanplakorn N, Tamaki K, Ueno T, Toi M, Loo WT, Chow LW, Suzuki T, Sasano H. Effects of estrogen depletion on angiogenesis in estrogen-receptor-positive breast carcinoma—an immunohistochemical study of vasohibin-1 and CD31 with correlation to pathobiological response of the patients in neoadjuvant aromatase inhibitor therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2012 Mar;16 Suppl 1:S69-78.

- [57] Tlsty TD, Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:119-150.
- [58] Liu S, Jiang M, Zhao Q, Li S, Peng Y, Zhang P, Han M. Vascular endothelial growth factor plays a critical role in the formation of the pre-metastatic niche via prostaglandin E2. *Oncol Rep.* 2014 Dec;32(6):2477-2484.
- [59] Zhang M, Qiu L, Zhang Y, Xu D, Zheng JC, Jiang L. CXCL12 enhances angiogenesis through CXCR7 activation in human umbilical vein endothelial cells. *Sci Rep.* 2017 Aug 15;7(1):8289.
- [60] Marioni G, Gaio E, Giacomelli L, Marchese-Ragona R, Staffieri C, Staffieri A, Marino F. Endoglin (CD105) expression in head and neck basaloid squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol.* 2005 Mar;125(3):307-311.
- [61] Marioni G, Staffieri A, Hagen R, Ottaviano G, Lionello M, Staffieri C, Giacomelli L, Blandamura S. Prognostic value of hypoxia-inducible factors (angiogenin and endoglin) in open partial laryngectomies: uni- and multivariate analyses. *Am J Otolaryngol.* 2013 Jan-Feb;34(1):3-9.
- [62] Gradecki SE, Grange JS, Stelow EB. Concordance of PD-L1 Expression Between Core Biopsy and Resection Specimens of Non-Small Cell Lung Cancer. *Am J Surg Pathol.* 2018 Aug;42(8):1090-1094.
- [63] Szade J, Majewska HI, Żaczek AJ, Biernat W. High-grade non-small cell lung carcinoma: a comparative analysis of the phenotypic profile in small biopsies with the corresponding postoperative material. *Pol J Pathol.* 2019;70(2):100-108.
- [64] Dorff TB, Longmate JA, Pal SK, Stadler WM, Fishman MN, Vaishampayan UN, Rao A, Pinski JK, Hu JS, Quinn DI, Lara PN Jr. Bevacizumab alone or in combination with TRC105 for patients with refractory metastatic renal cell cancer. *Cancer.* 2017 Dec 1;123(23):4566-4573.
- [65] Zhang J, Zhang L, Lin Q, Ren W, Xu G. Prognostic value of endoglin-assessed microvessel density in cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2017 Dec 21;9(7):7660-7671.