

**Università degli Studi di Milano
Scuola di Dottorato in Medicina Molecolare
Dipartimento di Scienze e Tecnologie
Biomediche**

**Curriculum di Oncologia Molecolare
Ciclo XXIV
Anno Accademico 2010-2011**

**Dottorando: Antonella MARZORATI
Matricola: R08157**

**Ricerca di micrometastasi linfonodali in
pazienti con NSCLC
Analisi molecolare del CEA mRNA mediante
Real Time RT-PCR e valutazione del suo valore
prognostico**

**Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Mario Clerici
Tutore: Prof. Silvano BOSARI
Correlatore: Dott. Dario RUSSO**

INDICE

1.	INTRODUZIONE	Pag 6
1.1	Significato ed importanza della ricerca delle micrometastasi nei carcinomi polmonari	Pag 7
1.2	Fattori che influenzano lo sviluppo di micrometastasi nei tumori solidi	Pag 8
1.3	Sedi di ricerca delle micrometastasi	Pag 9
2.	CARCINOMA POLMONARE	Pag 12
2.1	Incidenza e mortalità	Pag 13
2.2	Sopravvivenza	Pag 15
2.3	Eziologia e fattori di rischio	Pag 15
2.3.1	Fattori ormonali	Pag 17
2.3.2	Fattori genetici	Pag 17
2.3.3	Cambiamenti molecolari	Pag 18
2.4	Fattori che influenzano lo sviluppo di micrometastasi	Pag 20
2.5	Classificazione tumorale	Pag 21
2.5.1	Carcinoma a cellule squamose	Pag 22
2.5.2	Adenocarcinoma	Pag 22
2.5.3	Carcinoma a grandi cellule	Pag 23

2.5.4	Lesioni preinvasive, sia squamose che non squamose	Pag 23
2.6	Stadiazione TNM	Pag 24
2.6.1	Estensione e localizzazione del tumore – T	Pag 26
2.6.2	Coinvolgimento linfonodale – N	Pag 27
2.6.3	Presenza di metastasi – M	Pag 28
2.7	Iter diagnostico	Pag 29
2.7.1	Segni e sintomi	Pag 29
2.7.2	Strategia diagnostica	Pag 30
2.7.3	Terapie adiuvanti	Pag 31
2.7.4	Diagnosi micrometastasi	Pag 32
3.	ANTIGENE CARCINO-EMBRIONARIO (CEA)	Pag 34
3.1	CEA	Pag 35
3.2	Struttura e funzioni	Pag 35
3.3	Patologie e CEA	Pag 37
3.4	CEA Sierico	Pag 38
3.5	CEA Tissutale	Pag 40
3.6	CEA e TNM	Pag 42
4.	OBBIETTIVI DELL'ATTIVITA' DI RICERCA	Pag 44
4.1	Scopo	Pag 45
4.2	Obbiettivi prefissati	Pag 48

5.	MATERIALI E METODI	Pag 49
5.1	Casistica	Pag 50
5.1.1	Pazienti	Pag 50
5.1.2	Neoplasie e linfonodi locoregionali	Pag 50
5.1.3	Follow-up	Pag 57
5.2	Allestimento dei preparati	Pag 58
5.3	Colture cellulari	Pag 58
5.4	Costruzione della curva standard	Pag 59
5.5	Estrazione dell'RNA	Pag 60
5.6	Studio iniziale	Pag 61
5.6.1	Retrotrascrizione	Pag 61
5.6.2	Primers e Probes	Pag 61
5.6.3	Quantificazione mediante TaqMan system Real-Time RT-PCR	Pag 62
5.6.4	Quantificazione del messaggero del CEA nei linfonodi polmonari	Pag 62
5.6.5	Reazione Di Amplificazione Quantitativa In Real Time Rt-PCR	Pag 63
5.7	Secondo studio	Pag 64
5.7.1	Primers e probe	Pag 64
5.7.2	Reazione Di RetroAmplificazione ONE-STEP Quantitativa In Real Time RT-PCR	Pag 65
5.7.3	Q3 Real-Time PCR	Pag 66

6.	RISULTATI	Pag 67
6.1	Curva Standard	Pag 68
6.2	Ricerca di micrometastasi linfonodali in Pazienti NSCLC	Pag 70
6.2.1	Valutazione dei pazienti istologicamente N0	Pag 71
6.2.2	Valutazione dei pazienti istologicamente N1	Pag 71
6.2.3	Valutazione dei pazienti istologicamente N2	Pag 72
6.3	Valutazione pazienti con recidiva	Pag 73
6.3.1	Valutazione di recidiva nella casistica istologicamente N0	Pag 74
6.3.2	Valutazione di recidiva nella casistica istologicamente N1 e N2	Pag 74
6.3.3	Valutazione di recidiva nella casistica molecolarmente positiva	Pag 75
6.3.4	Valutazione del tempo di recidiva verso quantitativo di CEA mRNA	Pag 76
6.4	Ristadiazione su base molecolare	Pag 79
6.4.1	Recidiva verso ristadiazione molecolare	Pag 80
6.5	Analisi Molecolare RetroAmplificazione ONE- STEP 7500 FAST	Pag 82
6.6	Analisi Molecolare RetroAmplificazione ONE- STEP Q3 Real-Time PCR	Pag 84
7.	DISCUSSIONE RISULTATI	Pag 86
7.1	Scelta dello studio	Pag 87

7.2	Scelta della Metodica	Pag 88
7.3	Scelta del marcatore	Pag 89
7.4	Valutazione delle cruve standard di calibrazione	Pag 90
7.5	Valutazione dell'integrità dei campioni	Pag 91
7.6	Valuazione della ricerca di micrometastasi linfonodali in Pazienti NSCLC	Pag 91
7.7	Valutazione del significato prognostico del CEA mRNA nei pazienti con micrometastasi	Pag 92
7.7.1	CEA mRNA e tempo di recidiva	Pag 93
7.8	Ristadiazione su base molecolare	Pag 94
7.9	Ottimizzazione dell'analisi molecolare	Pag 95
7.10	Valutazione Q3 Real-Time PCR	Pag 96
8.	CONCLUSIONI	Pag 97
9.	BIBLIOGRAFIA	Pag 99

1. INTRODUZIONE

1.1 Significato ed importanza della ricerca delle micrometastasi nei carcinomi polmonari

Nei carcinomi polmonari, come in tutte le neoplasie, la determinazione dello stadio tumorale è di grande importanza in termini d'implicazioni terapeutiche e prognostiche. Un'attenta valutazione diagnostica iniziale, per definire la stadiazione e per individuare coinvolgimenti metastatici, è di ampio rilievo nelle diagnosi dei pazienti maggiormente a rischio, in quanto permetterebbe di sottoporli alle terapie più adatte.

Nonostante le più avanzate tecnologie di indagine diagnostica oggi a nostra disposizione, il 30-40% dei pazienti sottoposti ad intervento chirurgico e portatori di carcinoma polmonare in stadio precoce mostrano una ripresa di malattia entro 24 mesi dalla chirurgia.

Questi dati possono essere attribuiti alla presenza di micrometastasi linfonodali che le procedure diagnostiche standard non sono state in grado di rilevare.

L'identificazione di nuove metodiche, in grado di individuare la malattia minima residua, risulta essere ad oggi la strategia vincente per il miglioramento della prognosi dei pazienti.

Negli ultimi anni, la ricerca scientifica ha evidenziato come le tecniche di biologia molecolare stiano affiancando la diagnostica clinica migliorando la qualità dei risultati.

Con metodiche quali la Real-Time PCR si prospetta la possibilità di identificare precocemente le cellule tumorali micrometastatiche linfonodali.

L'identificazione delle micrometastasi linfonodali con l'ausilio della biologia molecolare e della Real-Time PCR potrebbe quindi avere un impatto clinico notevole:

- permetterebbe di ottenere un'elevata sensibilità/specificità, portando all'identificazione del tumore residuo anche in pazienti risultati negativi a micrometastasi all'analisi istopatologica;
- determinerebbe una velocizzazione dei tempi diagnostici e a una rilevazione della patologia nella sua fase precoce;
- consentirebbe di personalizzare e migliorare la qualità delle cure ed il loro esito negli stadi già avanzati.

1.2 Fattori che influenzano lo sviluppo di micrometastasi nei tumori solidi

Lo sviluppo delle micrometastasi costituisce un evento complesso e altamente selettivo, che dipende da un'interazione tra i fattori dell'ospite e le caratteristiche specifiche delle cellule tumorali.

Una micrometastasi viene definita come una metastasi con dimensione inferiore o uguale a 0.2 cm. Morfologicamente è caratterizzata da un gruppo di cellule tumorali che ha preso contatto, invaso e penetrato i vasi sanguigni e linfatici, mostrando reazioni stromali e proliferazione extravascolare (Joint Committent on Cancer Staging Manual" (AJCC), 1997) (1).

La probabilità di metastatizzare dipende da vari fattori, compresi la sede, la dimensione e le caratteristiche istologiche del tumore primitivo, oltre che da eventi generici ancora solo in parte conosciuti.

Tra i diversi fattori biologici che conferiscono alle cellule tumorali potenzialità metastatica, le proprietà adesive sembrano avere una particolare importanza. Il danneggiamento nell'espressione della molecola di adesione E-caderina è stata ampiamente accettata come evento critico per l'invasione tumorale e lo sviluppo di metastasi (2). Cellule tumorali invasive down-regolano l'adesione cellula-cellula, alterando il loro legame con la matrice extracellulare (ECM) e cambiando i profili di espressione delle integrine.

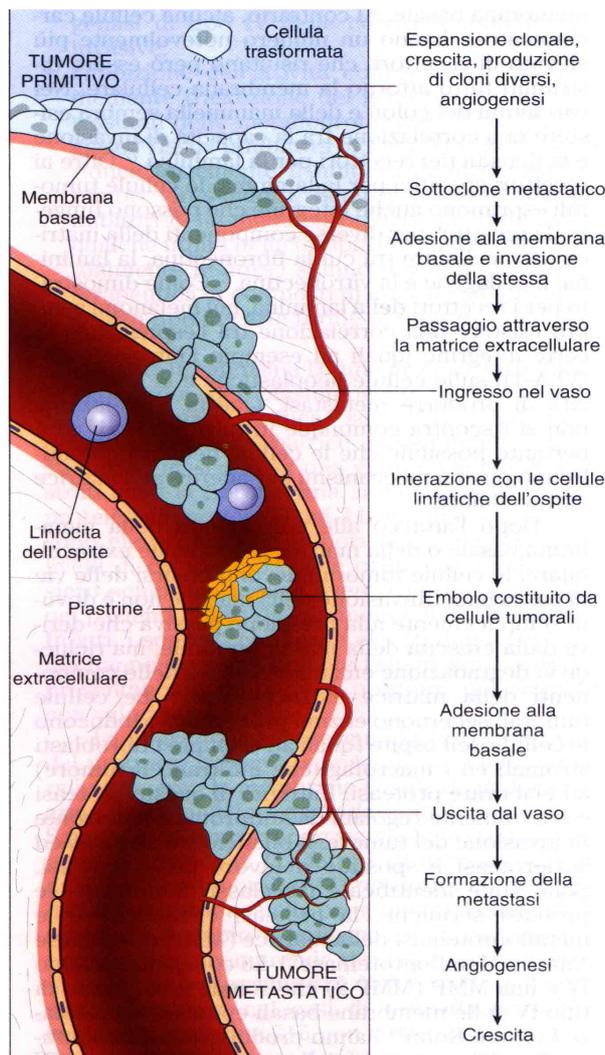
Un ruolo simile, è stato proposto per il CarcinEmbryonic Antigen (CEA). Come membro della superfamiglia delle immunoglobuline, il CEA è infatti coinvolto nel riconoscimento e nell'adesione intercellulare e può facilitare il processo di metastatizzazione (3). Un esempio di quanto descritto è stato verificato in diversi studi sull'adenocarcinoma del colon, dove è stato riportato che il CEA possa favorire il legame delle cellule cancerose al collagene di tipo I (4,5). In aggiunta, pazienti con elevati livelli sierici di CEA, sono stati indicati avere una maggior invasione vascolare e permeazione linfatica (6), permettendo al CEA di candidarsi come fattore influenzante lo sviluppo di micrometastasi.

Un ruolo molto importante viene giocato dai fattori di crescita angiogenetici. Il tumore, non potendo crescere oltre i 2mm senza acquisire una nuova

vascolarizzazione, attiva una cascata governata dai segnali d'ipossia che induce nelle cellule tumorali la produzione di fattori di crescita quali il VEGF e il bFGF. I vasi tumorali neoformati hanno la caratteristica di essere più permeabili di quelli normali, aumentando in questo modo il rischio di metastatizzazione.

1.3 Sedi di ricerca delle micrometastasi

Un tumore diffonde per diffusione continua, locale o per propagazione a distanza. Le tre diverse modalità possono coesistere, ma l'ultima implica la presenza di discontinuità fra la sede primitiva e i focolai secondari. Quindi le neoplasie metastatizzano allorché alcune cellule neoplastiche abbandonano il sito di origine e si diffondono nell'organismo attraverso i canali preesistenti (vasi ematici e linfatici), gli spazi connettivali e le grandi cavità.



Le disseminazioni per contatto sono rappresentate dalla diffusione locale per continuità e contiguità, che seguono la via "di minore resistenza", e dall'impianto diretto in cavità o superfici del corpo (transcelomatica), come il peritoneo, la pleura e il pericardio.

Molto importante risulta essere anche la diffusione per via ematica (propagazione a distanza), la quale segue

la direzione del circolo sanguigno e, per tale motivo, può essere di aiuto per spiegare la preferenza del distretto di formazione delle metastasi.

Diversi gruppi di studio stanno concentrando le loro risorse per l'individuazione delle Cellule Tumorali Circolanti, utili indicatori "precoci" di neoplasie occulte.

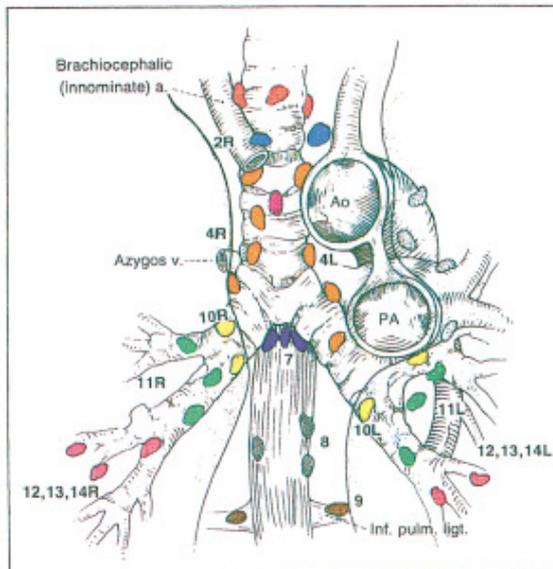
Ultima, ma non per questo meno importante è la diffusione delle cellule metastatiche ai linfonodi che segue le vie naturali del drenaggio linfatico. La produzione di metastasi linfonodali è caratteristica dei carcinomi. Le cellule neoplastiche con potenziale metastatico giungono al seno marginale di un linfonodo attraverso i vasi linfatici afferenti, seguendo la corrente della linfa. La tendenza al superamento, più o meno precoce, della capsula linfonodale dipende essenzialmente dall'istotipo, ma quando l'adenopatia supera certe dimensioni (circa 5 cm) la rottura capsulare con estrinsecazione è praticamente costante per tutte le neoplasie. All'interno di una stazione linfonodale, l'invasione neoplastica avviene inizialmente in modo piuttosto ordinato, da un linfonodo all'altro, e questo fatto deve essere tenuto presente durante l'esecuzione di un intervento chirurgico. Situazioni esemplificative sono fornite in parte dal carcinoma mammario, dove la progressione segue un preciso ordine che permette l'identificazione del linfonodo sentinella: il primo linfonodo che viene interessato dal processo di metastatizzazione.

Questo percorso ordinato di metastatizzazione linfonodale deve essere tenuto ben presente: l'individuazione o l'assenza di metastasi nei linfonodi locoregionali è il più importante fattore di rischio per pazienti con tumori solidi quando non c'è evidenza di metastasi sistemica. Sono stati pubblicati numerosi studi che hanno evidenziato come nei pazienti con linfonodi positivi alle micrometastasi la prognosi non sia uguale a quella di pazienti con linfonodi negativi. La presenza cioè di micrometastasi è associata a una maggior ripresa della malattia e questo è altresì collegato alla stazione linfonodale interessata. Nel caso proprio della neoplasia oggetto di questo studio, il Carcinoma Polmonare non a piccole cellule, i pazienti con interessamento dei linfonodi mediastinici hanno prognosi peggiore rispetto a quelli con metastasi presenti nei linfonodi ilari.

Si rimarca quindi la necessità di una corretta identificazione delle micrometastasi linfonodari al fine di predire una prognosi più accurata al paziente.

Mappa stazioni linfonodali

AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE
 MEDICINE VOL. 156 1997



N₂ NODES **SUPERIOR MEDIASTINAL NODES**

- 1 Highest Mediastinal
- 2 Upper Paratracheal
- 3 Pre-vascular and Retrotracheal
- 4 Lower Paratracheal (including Azygos Nodes)

AORTIC NODES

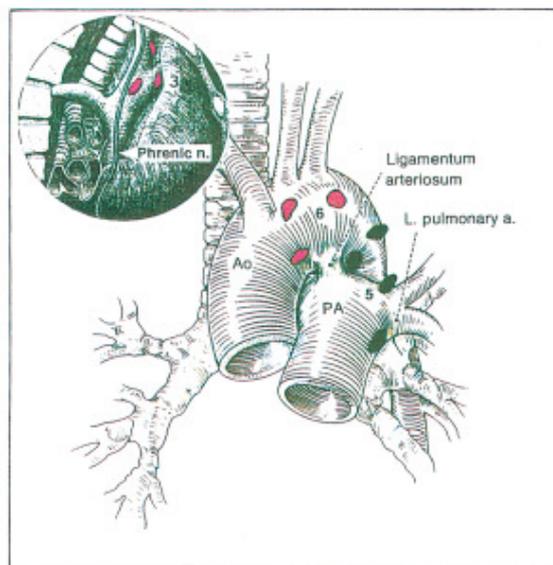
- 5 Subaortic (A-P window)
- 6 Para-aortic (ascending aorta or phrenic)

INFERIOR MEDIASTINAL NODES

- 7 Subcarinal
- 8 Paraesophageal (below carina)
- 9 Pulmonary Ligament

N₁ NODES

- 10 Hilar
- 11 Interlobar
- 12 Lobar
- 13 Segmental
- 14 Subsegmental



2. CARCINOMA POLMONARE

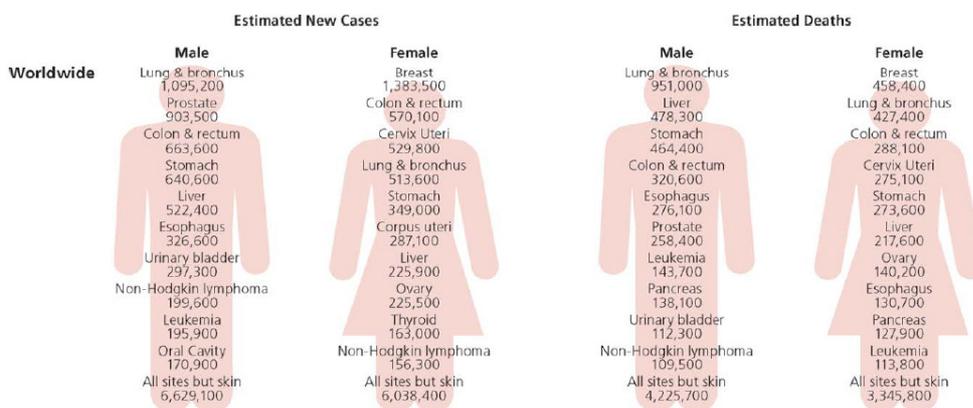
2.1 Incidenza e mortalità

Le neoplasie sono la prima causa di morte nei paesi economicamente sviluppati e la seconda causa di morte nei paesi in via di sviluppo. Una delle principali cause risulta essere l'invecchiamento della popolazione, che ha determinato un aumento notevole della percentuale di decessi, associata anche ad uno stile di vita poco adeguato (fumo, sedentarietà e dieta non salutare) (7).

I carcinomi polmonari rimangono la principale causa di morte legata ai tumori a livello mondiale. Un articolo pubblicato a marzo 2011 ha riportato che sono responsabili del 13% (1,6milioni) dei casi totali di cancro e del 18% (1,4milioni) dei decessi (7).

Colpisce prevalentemente il sesso maschile, mettendosi al primo posto come causa di morte per tumore maligno; tra il sesso femminile, è stato il quarto cancro più comunemente diagnosticato, dopo quelli al seno, al colon-retto e allo stomaco, e il secondo come causa di morte.

GLOBCAN, 2008. Incidenza e Mortalità nel Mondo. Global Cancer Statistic
2011



Il tasso di incidenza e mortalità tra le popolazioni Europee ed Americane varia dal 70% (Europa dell'Est) al 44% (Europa del Nord) per gli uomini, e dal 34% (Nord America) all'8% (Europa del Sud) per quanto riguarda le donne. Il carcinoma polmonare non a piccole cellule (in inglese *Non Small Cell Lung Cancer*, NSCLC), è causa di circa 85-90% di tutti i tumori al polmone.

Negli uomini, l'incidenza per età, aumenta rapidamente da 2 casi ogni 100.000 all'anno per pazienti sotto i 35 anni, ai 155 casi ogni 100.000 all'anno, per età compresa tra i 50-54 anni; in seguito l'incremento arriva a 437 casi ogni 100.000 annui per età compresa tra i 70/74 anni e a 456 casi ogni 100.000 annui per pazienti con età > di 75 anni.

Nelle donne le casistiche corrispondenti sono rispettivamente di 1, 21, 84 e 85 ogni 100.000 casi annui

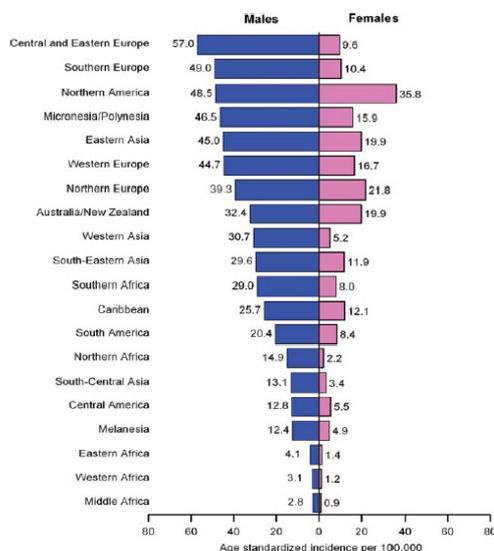
In Italia si è evidenziata una progressiva diminuzione dell'incidenza tra gli uomini, mostrando una riduzione annua del 1.4% con conseguente abbassamento del tasso di mortalità legato ai tumori polmonari. Questa diminuzione è maggiormente rappresentata dai gruppi di età più giovane, in cui l'abbandono dell'abitudine al fumo è maggiore.

Tra le donne i dati, rispetto alle diverse abitudini per quel che riguarda il fumo, sono piuttosto differenti da quelli degli uomini: infatti sia l'incidenza (+ 1.2% all'anno) che la mortalità (+ 0.9% all'anno) sono in aumento (7).

Nella maggior parte degli altri paesi l'incidenza delle neoplasie polmonari è maggiore tra le classi socio-economiche più basse, spiegata dalle differenze delle abitudini al fumo (7).

Dopo essere drammaticamente aumentata dal cambio di secolo, la mortalità per cancro al polmone tra gli uomini è ora in diminuzione in molte nazioni, inclusi Stati Uniti, Regno Unito, Danimarca e Finlandia (7).

GLOBOCAN, 2008: incidenza carcinoma polmonare per età, sesso e provenienza. Global Cancer Statistic 2011.



2.2 Sopravvivenza

Le prospettive di vita per i pazienti con tumore al polmone continuano a rimanere molto basse. In Europa, la percentuale di casi liberi da malattia risulta essere del 10% dopo 5 anni dalla resezione chirurgica (8). Tra i diversi istotipi di carcinoma polmonare, il carcinoma a piccole cellule risulta essere il più aggressivo e con prognosi peggiore (3% di sopravvivenza a 5 anni); invece tra i pazienti con NSCLC la percentuale sale al 16%.

La sopravvivenza risulta essere fortemente dipendente dall'età di diagnosi. Nei gruppi di giovane età (15-44 anni) la sopravvivenza relativa a cinque anni presenta una percentuale del 18%, rispetto al solo 6% nei pazienti con età superiore ai 75 anni.

Con il passare del tempo si è vista una modesta diminuzione dei tassi di mortalità. La sopravvivenza relativa è incrementata dal 7.5% negli uomini diagnosticati nel 1983-1985 al 9.2% in quelli diagnosticati tra il 1992-1994. Per le donne si è avuto invece un aumento dall'8.1% sino al 9.8% nello stesso periodo di tempo (9).

2.3 Eziologia e fattori di rischio

L'esatta eziologia delle neoplasie polmonari è tutt'oggi sconosciuta. Tuttavia, è noto che il fumo sia una delle principali cause di Ca polmonare (10), correlato principalmente con i carcinomi a grandi cellule e a cellule squamose (11); invece l'adenocarcinoma pare essere maggiormente presente in pazienti che non hanno mai fumato, prediligendo il sesso femminile (12-28) e i pazienti di età giovanile (<40anni) (29).

Il fumo di sigaretta è responsabile del 85-90% dei nuovi casi di cancro al polmone. Il grado di rischio dipende dal numero di sigarette per giorno, durata, età in cui si è iniziato a fumare e da quanto tempo si è smesso, tipo di inalazioni, catrame e nicotina contenuti nella sigaretta e presenza o meno di filtro.

È evidenza nota come anche il fumo passivo sia responsabile delle neoplasie polmonari in soggetti non fumatori. La grandezza del rischio è nell'ordine di almeno il 15-20%.

In conformità a quanto sopra riportato, esistono dati statistici indicanti che, anche se l'incidenza e il tasso di mortalità per i tumori ai polmoni è aumentato, questi valori hanno seguito i cambiamenti temporali dell'uso di tabacco (10). Negli Stati Uniti, il picco di incidenza e di mortalità sembra essere in diminuzione negli uomini ed essersi livellato nelle donne, in corrispondenza alla riduzione del vizio del fumo per le grandi campagne di misure contro il tabacco (30, 31). Simili osservazioni sono state riportate in altri paesi sviluppati, come il nord-ovest Europeo. In contrasto, la proporzione di pazienti affetti da carcinoma polmonare è aumentata dal 31% al 49,9% nei paesi in via di sviluppo, dato che si accosta con il rapido incremento del loro consumo di sigarette.

Uno studio di RT-PCR sull'angiogenesi (32) ha dimostrato una correlazione tra i livelli di VEGF nelle cellule di epitelio bronchiale di fumatori e la progressione da displasie di basso grado ad alto. Iperplasie bronchiali, metaplasie e carcinomi in situ sono associati all'incremento della densità del microcircolo. Questo dato rafforza quindi l'impatto negativo che il vizio al fumo può arrecare alla salute, stimolando la formazione di nuovi vasi e permettendo una crescita incontrollata delle cellule tumorali.

Studi epidemiologici hanno identificato molti altri fattori associati al carcinoma polmonare che rappresentano ben il 25% dei casi. Ne sono un esempio l'inquinamento atmosferico, i fattori genetici ed ormonali, l'esposizione professionale a elementi cancerogeni quali il radon, l'amianto, il cromo, il cadmio, il silicio, il nichel, effluvi di idrocarburi policiclici, composti dell'arsenico inorganico e anche fattori virali (33-36).

2.3.1 Fattori ormonali

Ponendo attenzione alla casistica femminile, è stato suggerito un possibile ruolo degli ormoni nello sviluppo dei carcinomi polmonari. Diversi studi hanno fornito elementi di prova a sostegno di un ruolo biologico degli estrogeni nella carcinogenesi del tessuto polmonare in quanto coinvolti direttamente con la proliferazione cellulare. I recettori per gli estrogeni ($ER\alpha$ e $ER\beta$) sono entrambi espressi nel tessuto polmonare sano, ma $ER\beta$ sembra essere riscontrato più frequentemente rispetto ad $ER\alpha$ (37) e la sua espressione è associata a una miglior prognosi nei casi di tumori NSCLC, mentre un'alta espressione di $ER\alpha$ è vista come fattore prognostico negativo (38, 39). Inoltre, gli estrogeni possono alterare il metabolismo di attivazione di agenti cancerogeni come gli IPA, promovendo così la carcinogenesi (40).

2.3.2 Fattori genetici

Anche se il cancro del polmone è comunemente considerato una malattia causata dall'esposizione a fattori ambientali, anche i fattori genetici giocano il loro ruolo.

Differenze razziali sono state evidenziate in merito al rischio familiare: in famiglie di colore, i parenti di primo grado con un individuo affetto da tumore al polmone, hanno il doppio del rischio di sviluppare lo stesso tumore rispetto alla loro controparte caucasica. (41)

Studi di epidemiologia genetica hanno suggerito che gli individui con il polimorfismo I462V a carico del citocromo P450 1A1 (CYP1A1) e/o la delezione in omozigosi del glutatione S-tranferasi (GSTM1) hanno un rischio maggiore di sviluppare cancro ai polmoni.

Fattori di rischio carcinoma polmonare. Nature Reviews, 2007

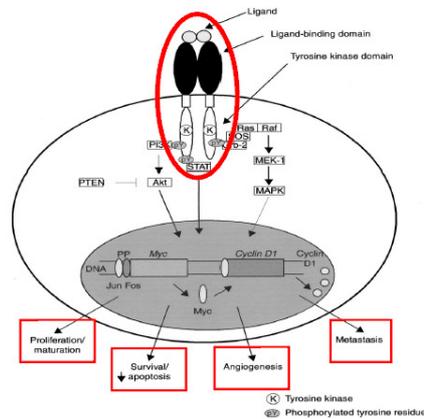
Risk factor	Risk estimate (95% CI)	Comments	Refs
Environmental ETS	1.19 (90% CI: 1.04–1.35)	Meta-analysis of 11 US studies of spousal exposure (females only)	48
	1.21 (1.13–1.30)	Meta-analysis of 44 case–control studies worldwide of spousal exposure	52
	1.22 (1.13–1.33)	Meta-analysis of 25 studies worldwide of workplace exposure	52
	1.24 (1.18–1.29)	Meta-analysis of 22 studies worldwide of workplace exposure	51
Residential radon	8.4% (3.0–15.8%) per 100 Bq m ³ increase in measured radon	Meta-analysis of 13 European studies	56
	11% (0–28%) per 100 Bq m ³	Meta-analysis of 7 North American studies	57
Cooking oil vapours	2.12 (1.81–2.47)	Meta-analysis of 7 studies from China and Taiwan (female never smokers)	71
Indoor coal and wood burning	2.66 (1.39–5.07)	Meta-analysis of 7 studies from China and Taiwan (both sexes)	71
	1.22 (1.04–1.44)	Large case–control study (2,861 cases and 3,118 controls) from Eastern and Central Europe (both sexes)	158
	2.5 (1.5–3.6)	Large case–control study (1,205 cases and 1541 controls) from Canada (significant for women only)	159
Genetic factors: family history, CYP1A1 Ile462Val polymorphism, XRCC1 variants	1.51 (1.11–2.06)	Meta-analysis of 28 case–control, 17 cohort and 7 twin studies	99
	2.99 (1.51–5.91)	Meta-analysis of 14 case–control studies of Caucasian never smokers	103
	2.04 (1.17–3.54)	Meta-analysis of 21 case–control studies of Caucasian and Asian never smokers (significant for Caucasians only)	104
	No association	Meta-analysis of 13 case–control studies	160
	No association overall; reduced risk 0.65 (0.46–0.83) with Arg194Trp polymorphism and 0.56 (0.36–0.86) with Arg280His for heavy smokers	Large case–control study from Europe (2,188 cases and 2,198 controls)	161
Viral factors: HPV 16/18	Increased risk for never smokers 1.3 (1.0–1.8) and decreased risk for heavy smokers 0.5 (0.3–1.0) with Arg299Gln	Large case–control study from the US (1,091 cases and 1,240 controls)	105
	10.12 (3.88–26.4) for never smoking	Case–control (141 cases, 60 controls) study from Taiwan of never	107

2.3.3 Cambiamenti molecolari

Recenti studi epidemiologici a livello molecolare hanno individuato tre geni coinvolti nella patogenesi dei tumori polmonari: EGFR; K-RAS e TP53.

EGFR appartiene a una famiglia di recettori di superficie tirosin-chinasici ed è sovra-espresso in molti tumori, tra cui il 50% dei casi di neoplasie polmonari (42). Questa proteina determina l'attivazione di cascate di segnalazione anti-apoptotiche, proliferative, angiogenetiche e di promozione del processo metastatico. Infatti, questa trasduzione del segnale porta all'attivazione di tre

patway: 1) Akt, che determina l'inibizione dell'apoptosi; 2) MAPK che determina l'aumento della proliferazione cellulare; 3) STAT, cascata di segnalazione con funzioni multiple.



Queste osservazioni hanno portato allo sviluppo e alla diffusione di test clinici basati sull'utilizzo di piccole molecole in grado di inibire le tirosin-chinasi (TKI) come l'erlotinib (Tarceva) e il gefitinib (Iressa) (43-45).

Sebbene questi inibitori abbiano avuto dei buoni effetti su casi con NSCLC, altri non hanno avuto la risposta desiderata. Successivamente, sono state scoperte delle mutazioni nel dominio tirosin-chinasico dell'EGFR associate alla sensibilità ai farmaci e ai trattamenti (46, 47). Mutazioni EGFR e quindi risposta a TKI si verificano solo in determinati tipi di tumore: adenocarcinoma, non fumatore, asiatico e sesso femminile (48, 49).

La proteina RAS gioca un ruolo importante a valle del pathway di segnalazione di EGFR, nella proliferazione cellulare (50). Mutazioni missenso a carico dell'oncogene KRAS determinano la perdita dell'attività intrinseca GTPasica che è necessaria per riportare allo stadio inattivo le proteine RAS (RAS-GDP). Pertanto, il controllo a feedback negativo di questa proteina viene perso, lasciando RAS mutato costitutivamente attivo.

Mutazioni a carico di questo gene sono state identificate solo in casi di NSCLC (prevalentemente adenocarcinomi), mentre non è mai stato documentato alcun rilevamento in pazienti con SCLC (49).

L'oncosoppressore p53 è un fattore trascrizionale di 53 kDa, codificato dal gene TP53. L'mRNA che traduce per p53 è trascritto in seguito a danno del genoma, provocato, ad esempio, da radiazioni, agenti chimici e stress ossidativo. La proteina p53 così tradotta porta alla trascrizione di p21 (arresto

del ciclo cellulare), di Gadd45 (riparazione del DNA) e di Bax (induttore dell'apoptosi).

Mutazioni inattivanti di p53 trasmesse con modalità autosomica recessiva sono le responsabili della sindrome di Li-Fraumeni, che rappresenta una condizione di rischio per lo sviluppo di carcinomi del polmone. Alterazioni di p53 nelle cellule dell'epitelio bronchiale con trasformazioni di tipo neoplastico in individui che non hanno ereditato l'allele mutato, sono presenti sia nel carcinoma polmonare a piccole cellule (>90%) che nei NSCLC (>80%). Tali mutazioni sono trovate con un'incidenza del 47%, anche se la frequenza risulta essere minore nei non fumatore (51,52).

2.4 Fattori che influenzano lo sviluppo di micrometastasi

Uno dei primi passi che determina l'invasione delle cellule tumorali micrometastatiche nei tessuti extratumorali è l'adesione alle cellule endoteliali dei vasi sanguigni. Questo evento viene mediato da molecole di adesione cellulare (*cell adhesion molecules* – CAMs), che comprendono la famiglia I-CAM ed N-CAM (integrine), lectine di superficie cellulare e glicoproteine che si legano alle lectine espresse dalle cellule. Un ruolo fondamentale in questa fase del processo metastatico è svolto dalle piastrine e dalle selettine E e P degli endotelioцити: infatti, le cellule neoplastiche, per potere ancorarsi stabilmente agli endotelioцити, devono essere fornite di ligandi per le selettine E e P e devono possedere proprie selettine che riconoscano ligandi consensuali espressi dagli endotelioцити.

Diversi studi hanno riportato che proprio nei pazienti affetti da NSCLC sia evidente l'acquisto di espressione di alcune molecole come l'MHC II e ICAM-1, correlando questo fattore con l'aumento delle potenzialità metastatiche del tumore.

Un altro fattore che influenza lo sviluppo di metastasi è l'angiogenesi.

Il conteggio dei microvasi intratumorali (MVC) costituisce un indice di questo processo. Un alto livello di questo è associato ad una rapida progressione tumorale e ad una cattiva prognosi in diversi tipi di tumore compreso quello al

polmone (53, 54). Uno dei principali fattori angiogenetici è il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF); questo stimola la proliferazione delle cellule endoteliali, la loro migrazione e la formazione tubulare. L'overespressione di VEGF è associata ad un alto indice MVC, ad una rapida progressione tumorale e ad una cattiva prognosi in molti tumori inclusi i NSCLC.

Parecchi studi recenti indicano che anche la p53 potrebbe essere implicata nell'angiogenesi. Dameron ed altri (55) mostrano che nei fibroblasti la p53 wild-type inibisce l'angiogenesi up-regolando la TSP-1 (thrombospondin-1), un potente inibitore dell'angiogenesi. In uno studio del 2002 (56) hanno dimostrato per la prima volta che l'alta espressione della p53 aberrante correla molto bene con l'elevata espressione dell'RNA messaggero sia del VEGF che della IL-8 nei NSCLC.

I dati suggeriscono che la p53 possa inibire l'angiogenesi regolando negativamente la trascrizione di VEGF e di IL-8 con meccanismi ancora poco chiari.

L'espressione aberrante della p53 è inoltre associata con un alto MVC, una bassa sopravvivenza ed una precoce ripresa di malattia.

Un recente lavoro (57) ha dimostrato che l'espressione aberrante della p53 e della p16 identifica i pazienti con NSCLC a peggior prognosi specialmente quelli in stadio I.

2.5 Classificazione tumorale

I carcinomi polmonari, per ragioni clinico-patologiche, sono suddivisi in due principali categorie: il Carcinoma non a piccole cellule (NSCLC), rappresentante l'85% di tutti i carcinomi polmonari, e il Carcinoma a piccole cellule (SCLC), con il 15% dei casi.

La classificazione dell'OMS sui tumori maligni, aggiornata nel 2004, include tra i carcinomi non a piccole cellule polmonari, i carcinomi a cellule squamose (SCC), gli adenocarcinomi (AD), i carcinomi a grandi cellule, i carcinomi adenosquamosi (con una duplice differenziazione adeno-squamosa), i carcinomi sarcomatoidi, i tumori carcinoidi e i tumori delle ghiandole salivari

(58). Gli istotipi più comuni sono l'adenocarcinoma, il carcinoma a cellule squamose e il carcinoma a grandi cellule, ma solo i primi due sottotipi costituiscono la vasta maggioranza di diagnosi per cancro polmonare.

2.5.1 Carcinoma a cellule squamose

Il carcinoma a cellule squamose comprende approssimativamente il 30% di tutti i casi di cancro al polmone. Viene riconosciuto grazie a sue caratteristiche istologiche come la formazioni di ponti intercellulari, formazione di perle squamose e di cheratinizzazione delle cellule.

Tra i carcinomi a cellule squamose si individuano diverse varianti, come a piccole cellule, a cellule chiare, il tipo papillare-verrocoide e il tipo basaloide.

Il Ca a cellule squamose è più frequente nei bronchi prossimali. È composto da cellule epiteliali con diversi gradi di differenziazione.

Una variante sia del carcinoma squamoso che di quello a grandi cellule, per il quale non è ancora stato documentato un unico comportamento biologico, è definito carcinoma basaloide. È un tumore a crescita lenta e il tempo richiesto per diventare clinicamente evidente è di 3 o 4 anni.

2.5.2 Adenocarcinoma

l'Adenocarcinoma rappresenta approssimativamente il 45% di tutti i tumori al polmone. E' il sottotipo diagnosticato con più frequenza (85%) nella maggior parte dei paesi (inclusa l'Europa, gli Stati Uniti e l'Asia.). La sua incidenza è pressoché invariata sia negli uomini che nelle donne, anche di età inferiore ai 60 anni (59). Deriva dalle cellule posizionate a livello duttulo-lobulare ed è frequentemente localizzato alla periferia del polmone. Viene riconosciuto e ulteriormente suddiviso grazie a diversi sottotipi istologici: AD acinare (formazione ghiandolare), AD papillare, AD bronchioalveolare (BAC) e AD solido con produzione di muco.

Il carcinoma bronchiolo alveolare (BAC) è una variante dell'adenocarcinoma; è un'entità clinica distinta, che frequentemente si presenta come malattia multifocale che si estende rapidamente da lobo a lobo includendo il polmone controlaterale. Il BAC si presenta con più probabilità in donne e nei non

fumatori. È stato riportato che la sopravvivenza sia migliore in pazienti con il BAC piuttosto che in pazienti con altri tipi istologici (60, 61).

L'*International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)*, l'*American Thoracic Society (ATS)* e l'*European Respiratory Society (ERS)* hanno sviluppato una nuova classificazione multidisciplinare per l'adenocarcinoma polmonare tenendo conto delle caratteristiche istologiche, molecolari e valutando anche gli esami radiologici in modo da trarre il maggior numero di informazioni prognostiche e predittive per il trattamento selezionato.

L'AD è stato riclassificato in tre principali gruppi: adenocarcinoma preinvasivo in situ, adenocarcinoma minimamente invasivo e adenocarcinoma invasivo (62).

2.5.3 Carcinoma a grandi cellule

Il carcinoma a grandi cellule è il tipo tumorale meno comune (15%). La maggior parte si presenta come una grande massa periferica con margini poco definiti; spesso ha una crescita molto rapida. Il carcinoma a grandi cellule comprende le seguenti varianti: carcinoma basaloide, carcinoma a grandi cellule neuroendocrine, carcinoma a grandi cellule con fenotipo rabdoide, carcinoma a cellule chiare e carcinoma simile a linfoepitelioma. Il loro comportamento clinico è simile a quello di un adenocarcinoma, ma essendo un tumore poco differenziato la sua diagnosi è difficoltosa e varia ampiamente andando per esclusione degli altri isotipi (63).

2.5.4 Lesioni preinvasive, sia squamose che non squamose

La classificazione dell'OMS del 2004 (58) ha incluso quattro tipi istologici di lesioni squamose preinvasive: displasia lieve, moderata, grave e carcinoma in situ. Non inclusa nella classificazione e riportata altrove è una lesione classificata come displasia angiogenica squamosa. Le lesioni non squamose preinvasive includono l'iperplasia adenomatosa atipica e l'iperplasia idiopatica delle cellule polmonari neuroendocrine; entrambe le lesioni sono rare.

2.6 Stadiazione TNM

La classificazione TNM dei tumori maligni (proposta da Pierre Denoix nel 1946) è il sistema di classificazione internazionale, a partire dal quale si può ricavare lo stadio della malattia, riassumendo le caratteristiche principali della sua estensione: classifica i tumori sulla base delle caratteristiche del tumore primario (T); la presenza o l'assenza di coinvolgimento dei linfonodi regionali (N), e la presenza o assenza di metastasi a distanza (M). La fase complessiva del tumore (stadio I a IV) è determinato dalla combinazione di T, N e M gradi. Il suffisso "X" è allegato (ad esempio, TX, NX, o MX) se l'estensione della malattia non può essere valutata per una qualsiasi di queste caratteristiche.

A partire dalla conoscenza dei parametri della classificazione TNM, si possono impostare le scelte terapeutiche e la prognosi (probabilità di guarigione) associata.

Il sistema di stadiazione TNM, per il carcinoma non a piccole cellule (NSCLC), è stato costruito basandosi su un'analisi retrospettiva di sopravvivenza in diversi pazienti rappresentanti tutte le fasi della malattia.

Essa riflette i metodi di valutazione clinica e trattamenti che vengono applicati alla popolazione di studio.

Tecniche di imaging avanzate e nuovi trattamenti modificano l'impatto di sopravvivenza, imponendo revisioni periodiche sul sistema TNM.

Attualmente è in vigore la 7° edizione TNM, pubblicata dall'*International Union Against Cancer and the American Joint Committee on Cancer*. Brevemente la classificazione per i carcinomi NSCLC si basa sulle seguenti caratteristiche riportate.

Le forme di carcinoma polmonare a piccole cellule vengono classificate in *limited* o *extended disease* in base alla possibilità o meno di colpire in fase radioterapica la massa tumorale mediante un'unica irradiazione. Le forme di tumore non a piccole cellule vengono classificate in base all'estensione del tumore (parametro **T**), alla localizzazione di linfonodi coinvolti (**N**) e alla

presenza di metastasi (**M**). Con tali reperti è possibile procedere alla classificazione mediante la seguente tabella:

	N0	N1	N2	N3
T1	Grado Ia	Grado IIa	Grado IIIa	Grado IIIb
T2	Grado Ib	Grado IIb	Grado IIIa	Grado IIIb
T3	Grado IIb	Grado IIIa	Grado IIIa	Grado IIIb
T4	Grado IIIb	Grado IIIb	Grado IIIb	Grado IIIb
M1	Grado IV	Grado IV	Grado IV	Grado IV

Com'è possibile notare, la presenza di metastasi a distanza, qualunque sia l'estensione e la presenza di metastasi linfonodali, promuove il tumore in categoria IV, caratterizzata da inoperabilità e sopravvivenza bassissima ad un anno. Un'ulteriore particolarità è rappresentata dal fatto che carcinomi privi di metastasi caratterizzati da parametri T4 o N3 sono sempre assegnati al grado IIIb. Sono considerati operabili gli stadi Ia, Ib, IIa, IIb e alcuni IIIa (pazienti in buone condizioni di salute e senza esteso coinvolgimento linfonodale). Gli stadi IIIb e IV sono da considerare sempre inoperabili; il trattamento di elezione è rappresentato dalla chemioterapia e dalla radioterapia.

2.6.1 Estensione e localizzazione del tumore – T

Il grado T può essere indagato mediante metodiche tomografiche, di risonanza magnetica (poco utilizzata nel polmone) e di videotoroscopia; quest'ultima trova particolare impiego nell'analisi del coinvolgimento mediastinico e delle strutture vascolari.

T (Tumore Primario)	
TX	Tx vuole indicare la presenza di tumore certo ma non ancora rilevabile mediante metodiche radiografiche e videoscopiche. La certezza di tumore è indicata dalla presenza di cellule maligne nell'escreato o nel liquido di lavaggio bronchiolo-alveolare (BAL).
T0	Assenza di tumore.
Tis	Carcinoma in situ.
T1	Tumore confinato all'interno del polmone e con un diametro inferiore a 3 cm. Non coinvolge i bronchi principali.
T1a	Tumore con un diametro \leq di 2 cm.
T1b	Tumore con diametro $>$ 2 cm ma \leq 3 cm.
T2	Tumore con diametro $>$ 3 cm, ma \leq 7 cm con almeno una delle seguenti caratteristiche (diviso poi nei sottostadi a e b come descritto sotto): coinvolgimento del bronco principale ma distante più di 2 cm dalla biforcazione della trachea, invasione della pleura viscerale, presenza di atelectasia o di polmonite ostruttiva che non coinvolge l'intero polmone.
T2a	Tumore con diametro $>$ 3 cm ma \leq 5 cm.
T2b	Tumore con diametro $>$ 5 cm ma \leq 7 cm.
T3	Tumore con almeno una delle seguenti caratteristiche: diametro $>$ 7cm, invasione della parete toracica, diaframma, pericardio parietale, coinvolgimento del bronco principale a meno di 2 cm dalla trachea ma senza coinvolgere la biforcazione bronchiale, atelectasia o polmonite dell'intero polmone, presenza di noduli satelliti nello stesso lobo.
T4	Tumore con almeno una delle seguenti caratteristiche: tumore di qualsiasi dimensione ma che invade il mediastino, il cuore, i grandi vasi mediastinici, la trachea, l'esofago o le vertebre, noduli tumorali satelliti in uno dei lobi omolaterali.

2.6.2 Coinvolgimento linfonodale – N

Con N si fa riferimento ai linfonodi coinvolti dal processo tumorale. Tale indagine può essere svolta mediante tomografia computerizzata o ad emissione di positroni. Il limite più spiccato di queste metodiche è l'incapacità di visualizzare coinvolgimenti senza tumefazione (nel caso della TC) e l'incapacità di dare informazioni su piccole formazioni (PET). Per questo, i linfonodi prelevati in corso di procedure di chirurgia toracica come la lobectomia o la pneumectomia, devono essere sempre analizzati in ambito anatomico-patologico per la ricerca di processi infiltrativi non espansivi e quindi non visualizzabili mediante procedure radiografiche.

N (Regional Lymph Nodes)	
NX	Metastasi linfonodali non rilevabili.
N0	Assenza di linfonodi colpiti.
N1	Colpiti i linfonodi subsegmentali, segmentali, lobari, interlobari o ilari omolaterali.
N2	Colpiti i linfonodi mediastinici omolaterali.
N3	Colpiti i linfonodi controlaterali o i linfonodi cervicali omolaterali. Metastasi nei linfonodi mediastinici e ilari controlaterali, nei linfonodi omolaterali o controlaterali scalenici o nei linfonodi sovraclavicolari.

2.6.3 Presenza di metastasi – M

Il grado M può essere indagato con la tomografia computerizzata al torace ed all'addome (surreni), la risonanza magnetica (soprattutto i distretti encefalici) e la scintigrafia ossea.

M (Distant Metastasis)	
MX	Metastasi a distanza non rilevabili.
M0	Assenza di metastasi.
M1	Presenza di metastasi a distanza (diviso in a e b secondo i criteri sotto).
M1a	Noduli separati nel polmone controlaterale, noduli pleurici o versamento pleurico o pericardico maligno.
M1b	Metastasi a distanza.

È ben documentato che la stadiazione TNM, dopo intervento chirurgico, è il più importante fattore prognostico nei pazienti con NSCLC (64). La sua precisione, tuttavia, si basa sostanzialmente sui dati anatomici dell'estensione tumorale, applicando le tradizionali tecniche di analisi patologica come la colorazione con ematossilina-eosina (HE).

Anche se la classificazione chirurgica-patologica può essere considerata il *gold-standard* per la stadiazione TNM, non ha potuto fornire stime soddisfacenti e accurate dei tassi di sopravvivenza nei primi stadi di tumore non a piccole cellule (NSCLC) (65).

Attualmente, tecniche quali l'immunoistochimica e la PCR, sono comunemente applicate nella rilevazione di micrometastasi linfonodali nei tumori maligni (66, 67). Queste metodiche, combinate con la stadiazione TNM, potrebbero migliorare la previsione di sopravvivenza e produrre stadiazioni più esatte.

L'Antigene CarcinoEmbrionario (CEA) è stato indicato come uno dei più popolari marker sierologici tumorale nei pazienti affetti da NSCLC. A conferma di quanto riportato è stato segnalato che l'aumento dei livelli sierici preoperatori del CEA è associato a uno stadio di malattia avanzato e a prognosi peggiori anche dopo un intervento chirurgico di successo. (68).

Considerando i recenti progressi nel campo della biologia molecolare, sono state proposte nuove tecniche per sviluppare una varietà di biomarcatori, come il CEA mRNA, associati alla detection di micrometastasi linfonodali o tissutali in pazienti con NSCLC (69). Alcuni esempi di tecniche che possono fornire metodi di rilevamento più sensibile sono l'IHC, la PCR, la citometria a flusso e l'utilizzo di isotopi radioattivi come per la ricerca del linfonodo sentinella nei breast-cancer.

Nonostante questi progressi l'*European Respiratory Society*, in congiunta con l'*American Thoracic Society*, non ha incluso il CEA o qualsiasi altro marcatore per diagnosi, screening, stadiazione o monitoraggio degli effetti del trattamento del carcinoma polmonare.

2.7 Iter diagnostico.

Correntemente, non vi sono procedure praticabili ed effettive in grado di fornire uno screening sulla popolazione generale per individuare precocemente il tumore del polmone. Gli studi randomizzati eseguiti non riescono a dimostrare una riduzione di mortalità legata specificamente alla malattia, né con citologie periodiche sull'escreato né radiografie al torace eseguite su gruppi screenati (70-73) a causa della bassa sensibilità di questi test.

2.7.1 Segni e sintomi

Approssimativamente, il 95% di pazienti che presentano un tumore al polmone hanno dei sintomi che frequentemente sono attribuiti ad effetti collaterali del fumo. I sintomi maggiormente presenti sono tosse, produzione di muco e affanno. Ognuno di questi può essere attribuito al fumo, fondamentalmente per bronchiti o ostruzioni croniche del polmone. Perdita di peso, raucedine e emottisi possono essere viste in pazienti che presentano una malattia più avanzata. Le sindromi paraneoplastiche sono riportate frequentemente in pazienti con un tumore al polmone. L'ostearteropatia ipertrofica polmonare è una delle più comuni ed è osservabile quasi

esclusivamente nell'adenocarcinoma. Le caratteristiche cliniche di queste condizioni sono il clubbing delle dita (della mano e del piede) e l'asimmetria dei periosti delle ossa lunghe distali. I pazienti possono lamentare dolore, sofferenza e gonfiore. In questi casi il trattamento con FANS è raccomandabile.

2.7.2 Strategia diagnostica

Un RX torace, una TC spirale ed un esame citologico dell'escreato sono raccomandati quando si sospetta un carcinoma polmonare. Una normale lastra del torace è in grado di evidenziare un tumore nella maggior parte dei casi; comunque, il 19% di NSCLC si presenta come una lesione nodulare che sfugge al RX (74). In caso di una radiografia polmonare normale con citologia del muco positiva, è raccomandata una broncoscopia. Quando è individuata con i raggi X una anomalia di dimensioni inferiori a 3 cm, è raccomandato un confronto con vecchie radiografie, poiché un'assenza di crescita dello stesso su un periodo di due anni suggerisce fortemente un processo benigno e può essere raccomandato un approccio osservativo con diverse radiografie (75).

La stadiazione tumorale preoperatoria di routine prevede radiografia del torace (CXR – *Chest X-Ray*) e una tomografia computerizzata assistita (TAC o CT). La PET (Tomografia a Emissione di Positroni) viene effettuata solo quando è richiesta un'indagine più approfondita. I pazienti vengono poi stadati secondo il sistema dell'*International Union Against Cancer*: classificazione TNM. L'istologia del tumore viene invece determinata secondo la classificazione postoperatoria dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (76).

Il follow-up postoperatorio prevede una CXR ogni 3 mesi e una CT addominale e al torace ogni 6 mesi per 5 anni dopo la resezione chirurgica. Nei pazienti sintomatici si eseguono ulteriori procedure per un'indagine più accurata: viene effettuata una risonanza magnetica, scintigrafia ossea e PET per poi proseguire con le terapie curative come la radioterapia o chemioterapia.

2.7.3 Terapie adiuvanti

Spesso, il tasso di sopravvivenza, dopo intervento chirurgico, in pazienti con stadi precoci di NSCLC non è ottimale. Per molti anni, i *trials* che hanno valutato la chemioterapia adiuvante non hanno dimostrato alcun beneficio significativo.

Successivamente, dal 2004 al 2006, tre studi hanno riportato dal 4% al 15% di guadagno assoluto sui 5 anni di sopravvivenza in pazienti che erano stati sottoposti a una completa resezione chirurgica del carcinoma NSCLC (77) e successivamente sottoposti a una chemioterapia utilizzando il cisplatino.

Nonostante i progressi nel detectare tale tumore nei primi stadi di sviluppo e il miglioramento dei trattamenti, i casi di NSCLC sono spesso diagnosticati in uno stadio avanzato di malattia, causa principale di una cattiva prognosi. Per supplire a questa mancanza, una possibile strada da percorrere sarebbe lo studio delle origini molecolari e delle loro evoluzioni nel progredire della malattia.

Il progresso e lo sviluppo di nuove tecnologie molecolari e la scoperta di nuovi marcatori possono essere utilizzati come potente arma per predire il rischio di cancro, una migliore prognosi e una terapia ottimale completamente personalizzata per prevenire e curare il cancro ai polmoni. (78).

Il profilo molecolare, incluso il profilo genetico e proteico, possono essere di sostegno per la guida nel trattamento clinico dei pazienti affetti da NSCLC. Purtroppo il progresso nell'identificazione di markers e mutazioni genomiche incontra diversi ostacoli per lo sviluppo di markers specifici come la grande eterogeneità presente a livello tumorale, il complesso intreccio tra i fattori ambientali a cui è sottoposto il paziente, la molteplicità e la ridondanza nei networks genetico ed epigenetico tumorale. L'eterogeneità molecolare nei tumori è il principale motivo per cui, pazienti con NSCLC con una stadiazione clinica e istologica simile, possono avere differenti percorsi clinici e differenti risposte ai trattamenti.

Sotto questa luce, la combinazione delle informazioni cliniche e molecolari potrebbe provvedere nel migliorare le indicazioni sul rischio di cancro (79) e nella prognosi (80).

Le tecniche emergenti in campo molecolare, riguardanti lo studio del DNA genomico, dell'RNA messaggero (mRNA), ma anche dei microRNA, dei processi di metilazione e dei pathway di segnalazione cellulare, possono essere di grande aiuto per sormontare questi ostacoli e per permettere di capire meglio il processo neoplastico. (78).

2.7.4 Diagnosi micrometastasi

Il trattamento chirurgico dei pazienti con NSCLC in stadio I e II continua ad evolversi mettendo sempre più in luce l'utilità dell'analisi delle micrometastasi linfonodali (81). Infatti, la sopravvivenza dei pazienti con tumore del polmone (NSCLC) in stadio I e II sottoposti a resezione chirurgica non è ottimale, probabilmente a causa di una occulta disseminazione sistemica di micrometastasi a livello linfonodale.

La principale causa potrebbe essere attribuita al fatto che, attualmente, le metodiche utilizzate per la valutazione e l'esame dello stato dei linfonodi, non presentano un'ottima sensibilità nella ricerca di micrometastasi.

La valutazione istologica dei linfonodi locoregionali non è ottimale per la ricerca delle micrometastasi, essendo basata sulla osservazione di un numero limitato di sezioni. Per aumentare la sensibilità di questa metodica, l'identificazione delle micrometastasi ai linfonodi è stata effettuata attraverso la valutazione di un numero esteso di sezioni seriate dello stesso campione colorate con ematossilina-eosina.

In questo modo, è stato possibile evidenziare cellule tumorali micrometastatiche in linfonodi giudicati negativi con la metodica standard in una percentuale di casi che oscilla, in letteratura, tra l'8% e il 30%. Tuttavia, questo metodo non è applicabile in laboratorio come procedura abituale a causa degli elevati costi e delle lunghe tempistiche necessarie (82).

Nonostante questi accorgimenti, il tasso di sopravvivenza dei pazienti liberi da malattia non ha avuto grandi miglioramenti.

Un aiuto in questo campo potrebbe essere dato dalle nuove tecniche di indagine molecolare che, grazie alla scoperta di nuovi marcatori tumorali, potrebbe mostrarsi una tecnica maggiormente sensibile, meno costosa e molto più veloce.

Studi su metodi di diagnostica molecolare hanno dimostrato una sensibilità maggiore nel rilevare la presenza di possibili micrometastasi linfonodali che non sono state riscontrate con i metodi diagnostici convenzionali (83, 84).

Uno studio comprovante questa analisi è stato pubblicato nel 2009 su *Lung Cancer*. Sono stati analizzati 132 linfonodi reputati negativi alle micrometastasi mediante analisi istologica. L'indagine molecolare, utilizzando l'mRNA del CEA come marcatore diagnostico, ha permesso di identificare 23 linfonodi (17%) positivi alle micrometastasi tumorali.

Il tasso di sopravvivenza libero da malattia nei pazienti positivi al CEA mRNA è significativamente inferiore rispetto ai pazienti risultati negativi.

Quindi la detection del CEA mRNA in linfonodi HE-negativi potrebbe migliorare la veridicità della stadiazione linfonodale e prevedere con maggior precisione la prognosi nei pazienti con NSCLC in stadio precoce.

Quanto citato sopra potrebbe aver un forte impatto sui tassi di sopravvivenza libera da malattia, che potrebbero aumentare con diagnosi più accurate.

Confrontando lo stadio di malattia e il livello di CEA in base alla sopravvivenza libera da malattia a 5 anni, si è osservato che i tassi di sopravvivenza per livelli di CEA inferiori a 30 ng/ml erano del 60% contro il 31,3% dei pazienti con livelli sierici superiori a 30ng/ml (6). Questi risultati suggeriscono che un'analisi preoperatoria dei livelli sierici del CEA possa essere utile come coadiuvante per il sistema vigente di stadiazione TNM. La presenza di un quantitativo elevato di CEA sierico è stato segnalato quindi come fattore prognostico e un indicatore di recidiva dopo resezione chirurgica nei pazienti con NSCLC (85-87), dimostrando che la combinazione dei livelli sierici per il CEA potrebbe essere utilizzato assieme alla stadiazione TNM per una predizione di sopravvivenza più esatta.

Pertanto, pazienti con un livello molto elevato di CEA dovrebbero ricevere particolari attenzioni come per esempio essere sottoposti a mediastinoscopia o PET o a TC a basso dosaggio e trattati successivamente con chemioterapia utilizzando il cisplatino.

La biologia molecolare si pone quindi come un ottimo supporto per le diagnosi pre e post-operatorie, portando ad una diagnosi più accurata che si esplica in un aumento della sopravvivenza libera da malattia.

3. ANTIGENE CARCINO-EMBRIONARIO (CEA)

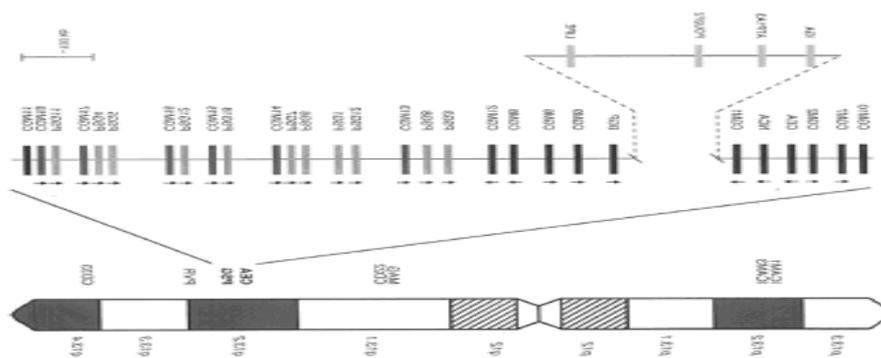
3.1 CEA

L'Antigene Carcino-Embrionario (in inglese *Carcino-Embryonic Antigen* - CEA) è una glicoproteina monomerica di membrana costituita per il 50% da carboidrati, altamente glicosilata e con un peso molecolare di 200 kDa (88). Venne identificata per la prima volta in uno studio del 1965, dove Phil Gold e Samuel O. descrissero la presenza di questa glicoproteina durante l'esame di membrane cellulari appartenenti a cellule neoplastiche di adenocarcinoma del colon (89). In modo indipendente, l'individuazione del CEA venne anche riportato in un lavoro di Von Kleist e Burtin nel 1969 in uno studio sui carcinomi coloretali (90).

3.2 Struttura e funzioni

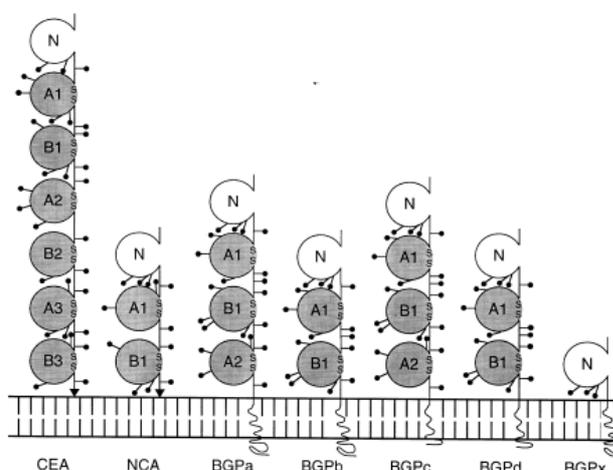
La famiglia genica, a cui appartiene il CEA, racchiude 29 geni diversi che rientrano nella superfamiglia delle immunoglobuline. L'analisi dettagliata delle sequenze nucleotidiche, ha permesso di suddividere questi geni in tre sottogruppi: il primo sottogruppo, a cui appartengono il CEA e gli NCA (Non-specific Cross-reacting Antigens), contiene 12 membri; il secondo gruppo, di cui fanno parte i PSG (*pregnancy-specific glycoprotein*), racchiude 11 proteine, mentre il terzo sottogruppo comprende sei membri. I geni del sottogruppo CEA sono localizzati sul cromosoma 19q13.2 (91), e più precisamente a metà della sottobanda q13.2, tra CY2A e D19S15, all'interno di una regione di 1,8 Mb (92, 93). Di questi geni, quattro (CGM8, 9, 10, 11 e 12) sono pseudogeni, mentre CEA, NCA, sNCA50r90, BGP, CGM1, CGM2, CGM6, sNCA95 e CGM7 sono espressi (94), con varie funzioni, in cellule e in diversi tessuti come le cellule della mucosa pilorica, il colon, il fegato, il rene e la vescica urinaria (95, 96).

Organizzazione genomica della famiglia CEA



La struttura del CEA, come anche la funzione, richiama quella delle immunoglobuline.

Tutte le molecole di CEA hanno un dominio N terminale di 108 aa omologo al dominio variabile delle Ig e presentano un dominio leader (L), di 34 aminoacidi, necessario per dirigere la proteina nascente attraverso il reticolo endoplasmatico fino all'inserimento in membrana, alla quale si ancora tramite il glicofosfatidil inositolo (GPI), o fino ad un'eventuale secrezione.



Le principali funzioni della famiglia CEA non sono ben conosciute, ma, come per le immunoglobuline, il CEA presenta un coinvolgimento nei processi di adesione cellulare, come le interazioni tra i granulociti e l'endotelio (97, 98). Studi in vitro, su linee cellulari tumorali, hanno dimostrato in modo convincente che il CEA può agire sia come molecola di adesione omofilica (CEA-CEA) che eterofilica (CEA-NCA). Infatti è noto da anni che le molecole a singola catena, appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline, sono

in grado di legarsi e formare complessi omodimeri o eterodimeri di ordine superiore.

Il dominio N è coinvolto direttamente con il fenomeno dell'adesione cellulare e tale funzione non sembra essere regolata né dalle concentrazioni di calcio né dalla temperatura. Ulteriori funzioni attribuite a questa famiglia includono ruoli nella trasduzione del segnale e nella cooperazione con proto-oncogeni nella trasformazione cellulare.

3.3 Patologie e CEA

I primi studi riguardanti il CEA avevano ipotizzato che fosse un antigene oncofetale, espresso durante la vita fetale e assente negli adulti sani tranne che in pazienti affetti da carcinomi. Ora sappiamo che questo concetto non è applicabile e in realtà il CEA è espresso anche nel tessuto normale adulto. (94)

Fisiologicamente, le cellule presentano un assetto polarizzato e l'espressione del CEA risulta essere localizzata solo a livello apicale. Durante la tumorigenesi, la polarizzazione cellulare è una delle caratteristiche che viene a mancare; di conseguenza, l'espressione del CEA si distribuisce, non più solo a livello apicale, ma su tutta la membrana cellulare. In questo modo, aumentando l'espressione sulla superficie delle cellule tumorali, vengono anche favorite quelle interazioni cellulari che permettono l'accrescimento tumorale, nonché i processi metastatici (99-101).

Analizzando queste proprietà in tumori con alta espressione cellulare del CEA, risulta quindi essere normale la loro spiccata capacità di aggregazione a livello cellulare, che porta a una maggior capacità invasiva e di creare metastasi a distanza.

3.4 CEA Sierico

Alcuni anni dopo la scoperta del CEA, lo stesso gruppo di ricerca ha riportato che questa glicoproteina poteva essere misurata nel siero di pazienti con carcinomi coloretali e di altro tipo mediante l'utilizzo di un sensibile radioimmunoassay (102).

Il suo tasso ematico, particolarmente ridotto di condizioni fisiologiche, aumenta in numerose condizioni patologiche: la concentrazione normale plasmatica del CEA varia da 0 a 2,5 - 3 ng/ml. Il siero di individui sani e di altri pazienti con diverse malattie avevano generalmente bassi livelli di CEA. Questo ha creato un'esplosione dell'interesse per questo marcatore tumorale, portando sviluppare molti saggi utilizzando il CEA per effettuare diagnosi, stadiazione, monitoraggio e prognosi dei carcinomi.

Tra la fine degli anni '70 e i primi anni '80 il CEA divenne il target favorito per la radioimmunolocalizzazione dei tumori al colon retto e di altre origini epiteliali.

Alti livelli di antigene carcinoembrionario sono stati riscontrati, oltre che nei tumori del colon-retto (70-90% dei pazienti affetti da neoplasie maligne del grosso intestino), anche in varie altre patologie maligne e benigne. Alcune patologie benigne, in cui viene citata la presenza del CEA, sono per esempio la pancreatite, la gastrite, l'ulcera peptica gastrica, la cirrosi epatica, gli stati uremici, gli itteri benigni, il morbo di Crohn, la colite ulcerosa e la diverticolosi (103).

I valori di CEA aumentano anche in una condizione non patologica piuttosto diffusa, che è quella dell'accanito tabagismo, collegandolo strettamente con il carcinoma polmonare (104). Infatti, altre patologie maligne associate ad un aumento sensibile dei livelli di antigene carcinoembrionario sono proprio i carcinomi polmonari, oltre a quelli della mammella, pancreatici, epatocellulari e tiroidei (105-107).

Purtroppo, non esistono valori soglia di CEA sierico che differenzino le patologie maligne da quelle benigne, anche se in generale, in quest'ultimo caso, gli aumenti sono rari o comunque contenuti (sotto i 3 ng/ml). Proprio

questa scarsa specificità e sensibilità dell'antigene carcinoembrionario non ne rendono possibile l'impiego come marcatore tumorale in metodiche di screening per il riconoscimento precoce delle patologie neoplastiche.

Il CEA trova invece la sua applicazione più frequente per monitorare la risposta dei pazienti affetti da carcinoma e sottoposti a terapia chirurgica o d'altro tipo, nonché come marker metastatico e di possibili recidive.

I pazienti con un elevato livello di CEA sierico sono infatti maggiormente più comuni tra quelli in stato avanzato, a causa di una maggior invasione vascolare e permeazione linfatica dovuta al processo di metastatizzazione (6).

Particolare attenzione viene quindi rivolta al monitoraggio dei livelli preoperatori di CEA, perché correlati al rischio di recidiva neoplastica dopo resezione del tumore primitivo. Inoltre, nel periodo post-operatorio, i livelli sierici di antigene carcinoembrionario vengono periodicamente monitorati, poiché rialzi sensibili dei suoi livelli sono una spia precoce di metastasi, che si accende già diverse settimane prima che le metodiche cliniche e strumentali riescano a rilevarle.

In definitiva, quindi, l'antigene carcino-embrionario non è specifico per alcun tipo di neoplasia, anche se valori superiori a 20 µg/ml sono significativamente correlati con metastasi e/o carcinoma primitivo.

La presenza in modo eterogeneo del CEA in diversi tessuti non ne ha quindi permesso l'utilizzo come marcatore tumorale e l'*European Respiratory Society*, in congiunta con l'*American Thoracic Society*, non ha incluso il CEA o qualsiasi altro marcatore per diagnosi, screening, stadiazione o monitoraggio degli effetti del trattamento del carcinoma polmonare.

Tuttavia, diversi studi hanno indicato che nei pazienti con NSCLC il CEA possa fornire informazioni utili per determinare la sopravvivenza indipendentemente dalla fase della malattia (108-113).

Quindi il CEA viene utilizzato come fattore predittivo di recidiva e indicatore di cattiva prognosi in pazienti affetti da tumore del polmone (114, 115), tesi in accordo con altri studi precedenti, che hanno riportato una correlazione tra CEA e tumori maligni polmonari nel 90% dei casi esaminati (116).

Altro punto su cui si sta cercando di far luce riguarda la correlazione dei livelli di espressione del CEA con diversi tipi istologici di tumori NSCLC, in quanto i più recenti rapporti hanno rilevato che tale correlazione rimane ancora oscura (85-87).

Un lavoro del 2004 ha riportato che alti livelli dei CEA sono maggiormente presenti in pazienti con AD rispetto a quelli con SCC (7,8 contro 5,5ng/ml, $p=0,0018$) (117), anche se la percentuale di pazienti positivi per il CEA è maggiore nell'SCC rispetto all'AD (SCC = 41,9%; AD=35,3%).

I pazienti con stadio clinico I e con alti livelli sierici di CEA preoperatorio hanno un decorso clinico peggiore. In aggiunta, sembra che i livelli sierici di CEA siano maggiori nei fumatori, come anche la percentuale di positivi fumatori (49,3%) rispetto ai positivi non fumatori (21,5%), correlando il fumo di sigaretta ad un elevato livello di sCEA (104). Per cui, dato che i livelli sierici maggiori sono stati riscontrati in pazienti con AD, questi sono stati associati anche ad una breve sopravvivenza.

3.5 CEA Tissutale

Per i pazienti affetti da NSCLC in stadio precoce, la miglior terapia curativa risulta essere la chirurgia. Ma in realtà, nonostante la resezione completa del tumore e la dissezione dei linfonodi (118) solo il 60-70% dei pazienti in stadio I e il 50% in stadio II presentano un tasso di sopravvivenza maggiore di 5 anni. Questi dati indicano che il rimanente 30-50% dei pazienti può andare incontro a diffusione di cellule tumorali, che pratiche cliniche attualmente disponibili, non sono riuscite a rilevare.

Attualmente, tecniche quali l'immunoistochimica e la PCR, sono comunemente applicate nella rilevazione di micrometastasi linfonodali nei tumori maligni (66, 67). Queste metodiche, combinate con la stadiazione TNM, possono migliorare la previsione di sopravvivenza e produrre stadiazioni più esatte.

Diventa però sempre più evidente che, in pazienti con NSCLC in stadi precoci, l'esame istopatologico riporti un numero maggiore di linfonodi regionali negativi per cellule tumorali (micrometastasi), rispetto a tecniche di

indagine molecolare, quali la Real-Time PCR quantitativa, che risulta essere più sensibile e specifica, soprattutto nelle prime fasi NSCLC.

L'RT-PCR è un metodo che può essere utilizzato per individuare le cellule tumorali occulte in campioni linfonodali, risultati negativi all'indagine istologica in pazienti con NSCLC.

In uno studio pubblicato su *Lung Cancer* nel 2006, 52 (25%) di 211 linfonodi istologicamente negativi sono risultati positivi per il CEA mRNA, mediante Real-Time RT-PCR, con un limite soglia di 25-100 cellule neoplastiche (119). Questi risultati indicano che micrometastasi, non rilevabili con esami convenzionali, possono essere rilevate mediante indagine molecolare.

Uno studio comprovante questa analisi è stato pubblicato nel 2009 su *Lung Cancer*. Sono stati analizzati 132 linfonodi reputati negativi alle micrometastasi mediante analisi istologica. L'indagine molecolare, utilizzando l'mRNA del CEA come marcatore diagnostico, ha permesso di identificare 23 linfonodi (17%) positivi alle micrometastasi tumorali.

Quindi la detection del CEA mRNA in linfonodi HE-negativi potrebbe migliorare la veridicità della stadiazione linfonodale e prevedere con maggior precisione la prognosi nei pazienti con NSCLC in stadio precoce (120).

Anche secondo un recente studio del 2011, l'esame immunocistochimico per l'individuazione del CEA, in pazienti affetti da carcinoma polmonare, ha mostrato che il 93,7% dei casi presentava un'espressione in vario grado di positività al CEA. L'81,25% di questi casi ha mostrato un'alta espressione di CEA e solo il 12,5% ha mostrato una bassa espressione del marcatore in esame. (121)

Per questo motivo, il CEA tissutale deve essere considerato come un potenziale marker per la valutazione del cancro polmonare e come indicatore di una cattiva prognosi, in quanto è stato dimostrato che neoplasie polmonari con un'alta espressione di CEA rilasciano un numero maggiore di cellule maligne nel flusso sanguigno aumentando il rischio di metastasi (122). Infatti, come membro della superfamiglia delle immunoglobuline, il CEA è coinvolto nel riconoscimento intercellulare e può facilitare il processo di

metastatizzazione (3), come accade per l'adenocarcinoma del colon, dove il CEA favorisce il legame delle cellule cancerose al collagene di tipo I (4, 5).

3.6 CEA e TNM

È ben documentato che la stadiazione TNM, dopo intervento chirurgico, è il più importante fattore prognostico nei pazienti con NSCLC (64). La sua precisione, tuttavia, si basa sostanzialmente sui dati anatomici dell'estensione tumorale, applicando le tradizionali tecniche di analisi patologica come la colorazione con ematossilina-eosina (HE).

Anche se la classificazione chirurgica-patologica può essere considerata la *gold-standard* per la stadiazione TNM, non ha potuto fornire stime soddisfacenti e accurate dei tassi di sopravvivenza nei primi stadi di tumore non a piccole cellule (NSCLC) (65).

Attualmente le linee guida per l'iter pre-operatorio non includono la misurazione dei livelli del CEA (86) e il livello di CEA preoperatorio non è stato preso in considerazione nella presente classificazione TNM (123, 124). Di conseguenza, il livello di CEA non è normalmente misurato in Europa e negli Stati Uniti.

Diversi gruppi hanno però lavorato al fine di verificare se il CEA potesse essere realmente un dato coadiuvante la classificazione TNM. Su pazienti affetti da NSCLC è stato riscontrato che un aumento sierico del CEA è correlabile alla stadiazione della malattia e livelli sierici preoperatori maggiori di 30ng/ml sono stati rilevati in pazienti con decorso clinico peggiore. Confrontando lo stadio di malattia e il livello di CEA in base alla sopravvivenza libera da malattia a 5 anni, si è osservato che i tassi di sopravvivenza per livelli di CEA inferiore a 30ng/ml erano del 60% contro il 31,3% dei pazienti con livelli sierici superiori a 30ng/ml (6). Questi risultati suggeriscono che un'analisi preoperatoria dei livelli sierici del CEA possa essere utile come coadiuvante per il sistema vigente di stadiazione TNM. La presenza di un quantitativo elevato di CEA sierico è stato segnalato quindi come fattore prognostico e indicatore di recidiva dopo resezione chirurgica nei pazienti con NSCLC (85-87). Questo dato porta alla dimostrazione che

l'analisi dell'sCEA potrebbe essere utilizzata assieme alla stadiazione TNM per una predizione di sopravvivenza più esatta.

Pertanto, pazienti con un livello molto elevato di CEA dovrebbero ricevere particolari attenzioni, come per esempio essere sottoposti a mediastinoscopia o PET o a TC a basso dosaggio e trattati successivamente con chemioterapia utilizzando il cisplatino.

Stessa argomentazione può essere portata a favore dei livelli di espressione del CEA mRNA nelle cellule neoplastiche misurata mediante analisi quantitativa molecolare.

Secondo lo studio condotto da Jianxing nel 2010 (120) la detection del CEA mRNA in linfonodi HE-negativi potrebbe migliorare la veridicità della stadiazione linfonodale e prevedere con maggior precisione la prognosi nei pazienti con NSCLC in stadio precoce. Infatti questo articolo riporta che la misurazione del CEA mRNA in Real-Time PCR è in grado di rilevare micrometastasi in pazienti affetti da NSCLC in stadio 1 N0, mostrando altresì che il tasso di sopravvivenza libero da malattia nei pazienti positivi al CEA mRNA è significativamente inferiore rispetto ai pazienti risultati negativi all'analisi molecolare.

4. OBIETTIVI DELL'ATTIVITA' DI RICERCA

4.1 Scopo

Il presente studio è stato intrapreso con un duplice obiettivo:

- 1) confermare l'utilità del CEA mRNA come biomarcatore molecolare per l'individuazione di micrometastasi linfonodali in pazienti affetti da NSCLC
- 2) verificare il possibile impiego di nuove tecniche molecolari nella rilevazione di cellule tumorali occulte non individuabili con i metodi di indagine convenzionali.

Verificati i principali obiettivi, il traguardo finale sarà l'impostazione di un kit diagnostico, rapido e di facile utilizzo. Questo, assieme alle analisi routinarie, permetterà un miglior inquadramento dello stadio di malattia del paziente e, di conseguenza, l'adozione delle terapie migliori per ogni singolo caso.

Un attento studio bibliografico ha evidenziato come il CEA mRNA possa essere considerato un potenziale strumento per la diagnosi di micrometastasi nel Ca polmonare.

Il primo studio che ha indagato, con metodiche molecolari, la bontà del CEA mRNA come marcatore per la ricerca di micrometastasi è stato pubblicato nel 2002 dal gruppo di Michael A. Maddus (125). In questo lavoro si è evidenziato come, mediante Real-Time PCR, la ricerca del CEA mRNA, in pazienti NSCLC, abbia identificato 59 linfonodi positivi su 232 appartenenti ad una casistica stadiata convenzionalmente T1N0 o T2N0.

A seguito di questo progetto, il gruppo di Nosotti et al. (126), nel 2005 ha pubblicato un articolo su *Chest*, dimostrando ampiamente l'utilità del CEA mRNA nel campo della ricerca delle micrometastasi. Questo studio, contrariamente al lavoro precedente, è stato fornito di un aggiornato follow-up, che ha permesso di valutare se l'identificazione di micrometastasi linfonodali, mediante Real-Time PCR quantitativa, avesse anche un significato prognostico.

In aggiunta ai due principali studi sopra riportati, in questi ultimi anni, diversi gruppi di ricerca hanno focalizzato la loro attenzione su questo biomarcatore, facendone crescere l'interesse.

Nel 2006, su *Lung Cancer*, è stato pubblicato un articolo che aveva valutato 211 linfonodi di pazienti istologicamente N0. Grazie alla detection del CEA mRNA, mediante Real-Time PCR, sono stati trovati 52 linfonodi positivi alle micrometastasi, con un limite di sensibilità di 25-100 cellule neoplastiche (119).

Anche l'analisi mediante diverse metodiche molecolari ha indicato la Real-Time PCR come miglior metodo. Questo studio è stato riportato sempre su *Lung Cancer* nel 2009, dove è stata valutata la classica Real-Time PCR (31 linfonodi positivi per CEA mRNA verso 132 linfonodi negativi all'indagine istologica) contro la LAMP, *loop-mediated isothermal amplification*, che ha mostrato positivi solo 23 linfonodi su 132.(127)

Un ulteriore studio, comprovante questi risultati, è stato pubblicato nel 2010: l'indagine molecolare di 193 linfonodi, reputati negativi alle micrometastasi mediante analisi istologica, ha permesso di identificare 32 linfonodi, che in realtà non erano liberi da malattia utilizzando un'analisi in Real-Time PCR (120). In questo articolo viene inoltre riportato come il tasso di sopravvivenza libero da malattia nei pazienti positivi al CEA mRNA (negativi istologicamente) sia significativamente inferiore rispetto ai pazienti risultati negativi all'analisi molecolare.

L'alto livello di espressione del CEA mRNA è stato inoltre correlato all'abitudine al fumo. La ricerca dell'RNA messaggero in lavaggi broncoalveolari, ottenuti da individui fumatori e comparati con fluidi derivanti da non fumatori, ha permesso di verificare l'aumento dell'espressione nella casistica "fumatori". Essendo ben nota l'influenza del tabagismo sullo sviluppo dei carcinomi polmonari, risulta essere chiara la correlazione di questo studio con l'aumento dell'espressione del CEA mRNA in pazienti affetti da tali neoplasie (128).

Per tutti questi motivi il CEA tissutale deve essere considerato come un potenziale marker per la valutazione dei carcinomi polmonari e come indicatore di una cattiva prognosi.

Lo studio intrapreso da Nosotti et al. è stato quindi ripreso per permettere l'ampliamento della casistica oggetto di questo studio, nonché l'aggiornamento del follow-up, unito all'utilizzo delle più moderne tecniche di indagine molecolare. Questo permetterà di avere una visione completa del potenziale del CEA mRNA come marcatore per micrometastasi linfonodali, e consentirà di poter prendere la decisione di introdurre la suddetta analisi per la valutazione dei pazienti affetti da carcinoma polmonare NSCLC.

4.2 Obiettivi prefissati

Le analisi effettuate sono state eseguite utilizzando come metodo di quantificazione la Real-Time PCR.

Sono state utilizzate tre diverse piattaforme:

- 1) Real-Time PCR 7900 Applied Biosystems;
- 2) Real-Time PCR 7500 FAST Applied Biosystems;
- 3) Real-Time PCR Q3 ST Microelectronics

Durante la prima fase, sono state seguite le metodiche utilizzate in precedenza, in modo da rendere uniformi i dati ottenuti con la casistica già sottoposta ad analisi.

Successivamente lo studio è stato spostato sul sistema Real-Time PCR 7500 FAST, strumento più moderno e performante. L'analisi quantitativa è stata effettuata mediante una miscela di RetroAmplificazione ONE-STEP, permettendo di ridurre la manodopera necessaria per l'impostazione delle reazioni, ma soprattutto di abbattere notevolmente i tempi e i costi necessari per ottenimento dei risultati.

L'ultima fase della nostra ricerca ha impiegato un prototipo di piattaforma per Real-Time PCR realizzato da ST Microelectronics con il supporto scientifico del team Clonit. L'utilizzo di questo sistema, ancora in fase di sviluppo, ha avuto come scopo di verificarne l'autentica capacità diagnostica, comparando i risultati ottenuti con quelli precedentemente analizzati sui due strumenti Applied Biosystem.

Tutti i dati ottenuti dai diversi supporti tecnologici sono stati interpretati con il follow-up clinico fornitoci dal gruppo chirurgico toracopolmonare dell'IRCSS Cà Granda-Ospedale Policlinico, permettendo una più completa valutazione prognostica del CEA mRNA come marcatore per micrometastasi linfonodali.

5. MATERIALI E METODI

5.1 Casistica

5.1.1 Pazienti

La ricerca del CEA mRNA è stata effettuata su 81 pazienti affetti da NSCLC, di cui 61 (75.3%) uomini e 20 (24.7%) donne. L'età media della casistica a disposizione corrisponde a 63 anni, con un range da 22 a 80 anni.

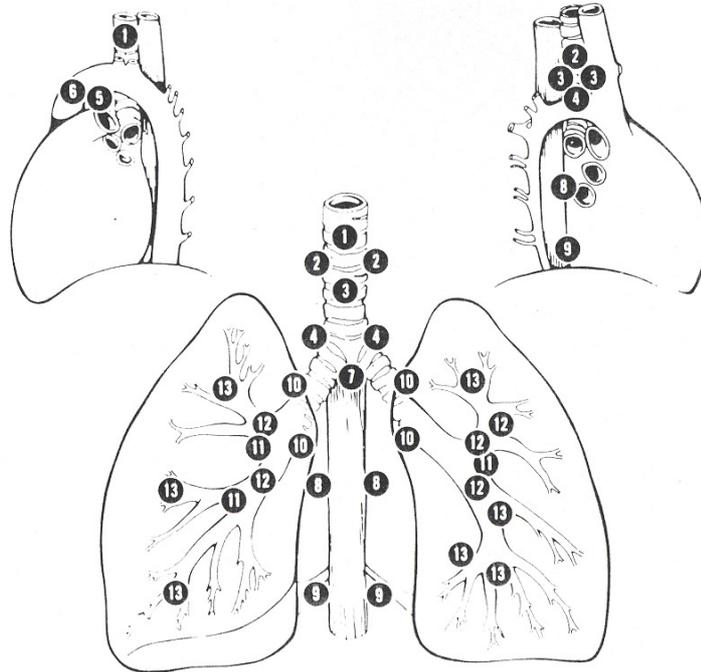
Nessuno dei pazienti considerati era stato sottoposto a chemioterapia o radioterapia prima dell'intervento chirurgico. Inoltre, per nessuno dei pazienti erano note neoplasie sincrone e/o pregresse insorte in altre sedi.

5.1.2 Neoplasie e linfonodi locoregionali

Il materiale impiegato nel presente studio deriva da pazienti sottoposti a linfadenectomia locoregionale. Grazie alla collaborazione con l'Ospedale Policlinico di Milano, tra il novembre 2000 e il dicembre 2004, sono stati valutati 305 linfonodi relativi a 81 pazienti con NSCLC che presentavano diversi stadi di malattia.

Per ogni neoplasia sono stati campionati da 1 a 8 linfonodi, prelevati al massimo da 8 stazioni linfonodali diverse.

Mappa linfonodale utilizzata per la stadiazione del carcinoma polmonare.



Linfonodi N2	<p>Linfonodi mediastinici superiori</p> <p>1. Mediastinici superiori 2. Paratracheali superiori 3. Pre- e retrotracheali 4. Paratracheali inferiori</p>
Linfonodi aortici	<p>5. Sottoaortici 6. Para-aortici</p>
Linfonodi mediastinici inferiori	<p>7. Subcarenali 8. Paraesofagei 9. Legamento polmonare</p>
Linfonodi N1	<p>10. Ilari 11. Iterlobari 12. Lobar 13. Segmentali</p>

La valutazione dell'istotipo e del grado di differenziazione delle neoplasie in esame è stata eseguita seguendo i criteri dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (*WHO classification* 1999-2004).

Classificazione istologica dei tumori polmonari *World Health Organization*,
2004

1 Epithelial Tumours
1.1. Benign
1.1.1. <i>Papillomas</i>
1.1.1.1. Squamous cell papilloma
Exophytic
Inverted
1.1.1.2. Glandular papilloma
1.1.1.3. Mixed squamous cell and glandular papilloma
1.1.2. <i>Adenomas</i>
1.1.2.1. Alveolar adenoma
1.1.2.2. Papillary adenoma
1.1.2.3. Adenomas of salivary-gland type
Mucous gland adenoma
Pleomorphic adenoma
Others
1.1.2.4. Mucinous cystadenoma
1.1.2.5. Others
1.2. Preinvasive lesions
1.2.1. <i>Squamous dysplasia/Carcinoma in situ</i>
1.2.2. <i>Atypical adenomatous hyperplasia</i>
1.2.3. <i>Diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia</i>
1.3. Malignant
1.3.1. <i>Squamous cell carcinoma</i>
Variants
1.3.1.1. Papillary
1.3.1.2. Clear cell
1.3.1.3. Small cell
1.3.1.4. Basaloid
1.3.2. <i>Small cell carcinoma</i>
Variant
1.3.2.1. Combined small cell carcinoma
1.3.3. <i>Adenocarcinoma</i>
1.3.3.1. Acinar
1.3.3.2. Papillary
1.3.3.3. Bronchioloalveolar carcinoma
1.3.3.3.1. Non-mucinous (Clara/pneumocyte type II)
1.3.3.3.2. Mucinous
1.3.3.3.3. Mixed mucinous and non-mucinous or intermediate cell type
1.3.3.4. Solid adenocarcinoma with mucin
1.3.3.5. Adenocarcinoma with mixed subtypes
1.3.3.6. Variants
1.3.3.6.1. Well-differentiated fetal adenocarcinoma
1.3.3.6.2. Mucinous ("colloid") adenocarcinoma
1.3.3.6.3. Mucinous cystadenocarcinoma
1.3.3.6.4. Signet-ring adenocarcinoma
1.3.3.6.5. Clear cell adenocarcinoma

- 1.3.4. *Large cell carcinoma*
 - Variants
 - 1.3.4.1. Large cell neuroendocrine carcinoma
 - 1.3.4.1.1. Combined large cell neuroendocrine carcinoma
 - 1.3.4.2. Basaloid carcinoma
 - 1.3.4.3. Lymphoepithelioma-like carcinoma
 - 1.3.4.4. Clear cell carcinoma
 - 1.3.4.5. Large cell carcinoma with rhabdoid phenotype
 - 1.3.5. *Adenosquamous carcinoma*
 - 1.3.6. *Carcinomas with pleomorphic, sarcomatoid or sarcomatous elements*
 - 1.3.6.1. Carcinomas with spindle and/or giant cells
 - 1.3.6.1.1. Pleomorphic carcinoma
 - 1.3.6.1.2. Spindle cell carcinoma
 - 1.3.6.1.3. Giant cell carcinoma
 - 1.3.6.2. Carcinosarcoma
 - 1.3.6.3. Pulmonary blastoma
 - 1.3.6.4. Others
 - 1.3.7. *Carcinoid tumour*
 - 1.3.7.1. Typical carcinoid
 - 1.3.7.2. Atypical carcinoid
 - 1.3.8. *Carcinomas of salivary-gland type*
 - 1.3.8.1. Mucoepidermoid carcinoma
 - 1.3.8.2. Adenoid cystic carcinoma
 - 1.3.8.3. Others
 - 1.3.9. *Unclassified carcinoma*
- 2 Soft Tissue Tumours
 - 2.1 Localized fibrous tumour
 - 2.2 Epithelioid hemangioendothelioma
 - 2.3 Pleuropulmonary blastoma
 - 2.4 Chondroma
 - 2.5 Calcifying fibrous pseudotumour of the pleura
 - 2.6 Congenital peribronchial myofibroblastic tumour
 - 2.7 Diffuse pulmonary lymphangiomatosis
 - 2.8 Desmoplastic small round cell tumour
 - 2.9 Other
- 3 Mesothelial Tumours
 - 3.1 Benign
 - 3.1.1 *Adenomatoid tumour*
 - 3.2 Malignant
 - 3.2.1 *Epithelioid mesothelioma*
 - 3.2.2 *Sarcomatoid mesothelioma*
 - 3.2.2.1 Desmoplastic mesothelioma
 - 3.2.3 *Biphasic mesothelioma*
 - 3.2.4 *Other*
- 4 Miscellaneous Tumours
 - 4.1 Hamartoma
 - 4.2 Sclerosing hemangioma
 - 4.3 Clear cell tumour
 - 4.4 Germ cell neoplasms
 - 4.4.1 *Teratoma, mature or immature*
 - 4.4.2 *Malignant germ cell tumour*
 - 4.5 Thymoma
 - 4.6 Melanoma
 - 4.7 Others
- 5 Lymphoproliferative Disease
 - 5.1 Lymphoid interstitial pneumonia
 - 5.2 Nodular lymphoid hyperplasia

5.3 Low-grade marginal zone B-cell lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue
5.4 Lymphomatoid granulomatosis
6 Secondary Tumours
7 Unclassified Tumours
8 Tumour-like Lesions
8.1 Tumourlet
8.2 Multiple meningothelioid nodules
8.3 Langerhans cell histiocytosis
8.4 Inflammatory pseudotumour (Inflammatory myofibroblastic tumour)
8.5 Organizing pneumonia
8.6 Amyloid tumour
8.7 Hyalinizing granuloma
8.8 Lymphangioliomyomatosis
8.9 Multifocal micronodular pneumocyte hyperplasia
8.10 Endometriosis
8.11 Bronchial inflammatory polyp
8.12 Others

Per quanto riguarda lo stadio tumorale sono state seguite le linee guida della classificazione TNM del 2002 per le neoplasie polmonari:

Polmone	
TX	Citologia positiva
T1	≤ 3 cm
T2	> 3 cm, bronco principale ≥ 2 cm dalla carena, invasione della pleura viscerale, atelectasia parziale
T3	Invasione della parete toracica, del diaframma, del pericardio, della pleura mediastinica, del bronco principale < 2 cm dalla carena, atelectasia di un intero polmone
T4	Invasione del mediastino, del cuore, dei principali vasi, della carena, della trachea, dell'esofago, delle vertebre; noduli separati nello stesso lobo, versamento pleurico neoplastico
N1	Peribronchiali e/o ilari omolaterali
N2	Mediastinici o sottocarinali omolaterali
N3	Mediastinici o ilari controlaterali, scalenici o sovraclaveari
M1	Comprende noduli neoplastici in altri lobi

L'analisi istopatologica ha pertanto suddiviso le neoplasie in esame nei seguenti istotipi:

Istotipo	Pazienti
Adenocarcinoma	61 (75,3%)
Carcinoma squamocellulare	17 (21%)
Carcinoma a grandi cellule	3 (3,7%)

I carcinomi, in base al grado di differenziamento, sono stati complessivamente identificati come di seguito:

Grado	Pazienti
G1-G2	41 (50.6%)
G3	40 (49.4%)

Per quanto riguarda lo stadio tumorale, i pazienti sono stati classificati come riportato in tabella:

Stadio	Pazienti
Stadio I (T1-2, N0, M0)	48 (59,3%)
Stadio II (T1-2-3, N0-1, M0)	15 (18.5%)
stadio III (ogni T, ogni N, M0)	15 (18,5%)
stadio IV (ogni T, ogni N, M1).	3 (3,7%)

La rappresentazione di questi stadi secondo le categorie T, N, M è riportata nella seguente tabella:

	N0	N1	N2	Totale
T1	12	2	-	14
T2	36 ^{***}	11 ^{**}	8	55
T3	2	-	1	3
T4	4 [*]	1	4	9
Totale	54	14	13	<u>81</u>

Nella casistica sono presenti anche tre pazienti a cui è stata diagnosticata la presenza di metastasi a distanza. La loro stadiazione era la seguente:

- 1- T4, N0, M1*
- 2- T2, N1, M1**
- 3- T2, N0, M1***

La tabella di seguito riporta schematicamente le caratteristiche clinico patologiche della casistica:

	Numero cas	Percentuale
Pazienti		
Maschi	61	75.3%
Femmine	20	24.7%
Istotipo		
Adenocarcinomi	61	75.5%
Squamocellulari	17	21%
Indifferenziati	3	3,7%
Stadio		
IA	12	14.8%
IB	35	43.2%
IIA	2	2.5%
IIB	12	14.8%
IIIA	9	11.1%
IIIB	8	9.9%
IV	3	3.7%
Grado di differenziazione		
G1-G2	41	50.6%
G3	40	49,4%

5.1.3 Follow-up

Ogni caso, dopo il trattamento chirurgico, è stato sottoposto a visite di controllo che sono state eseguite dopo uno e tre mesi dall'intervento; successivamente i pazienti sono stati sottoposti a controlli con scadenza trimestrale, durante il primo anno, e semestrale negli anni successivi. La ripresa di malattia, in sede o a distanza, è stata rilevata mediante TAC e/o RMN e, qualora sospettata è stata verificata istologicamente.

Questo continuo monitoraggio dello stato di salute dei pazienti ha permesso di fornire al presente studio un aggiornato follow-up per coadiuvare i dati ottenuti mediante l'analisi molecolare.

Allo stato attuale degli studi, il follow-up aggiornato riguarda 55 pazienti della casistica. Ciascun caso è stato seguito, quando possibile, per un periodo complessivo di 5 anni. I pazienti con periodi di follow-up minori rappresentano i casi con exitus, con insorgenza di neoplasie secondarie o casi in cui è risultato impossibile rintracciare il paziente.

5.2 Allestimento dei preparati

Ogni campione operatorio, rappresentato dai linfonodi locoregionali, è stato tempestivamente processato a fresco, entro 10 minuti dalla resezione chirurgica, per evitare la degradazione dell'RNA.

Una metà di ciascun linfonodo, correttamente classificato in base alla sede del prelievo, è stata rapidamente congelata in azoto liquido e conservata a – 80 °C in attesa di effettuare l'analisi molecolare.

La rimanente metà è stata fissata in formalina al 10%, routinariamente processata ed inclusa in paraffina per l'analisi istopatologica.

5.3 Colture cellulari

Il presente studio ha necessitato l'utilizzo di una linea cellulare tumorale epiteliale di mammella immortalizzata, MCF-7, nota per essere CEA mRNA positiva.

Questa linea cellulare è stata propagata in coltura con l'intento di ottenere l'mRNA del CEA derivante da un quantitativo noto di cellule. Scopo finale è stato la realizzazione di una curva standard per la quantificazione del nostro target in Real-Time PCR.

La coltura cellulare è stata espansa utilizzando terreni, siero fetale bovino (Celbio e Invitrogen Life Technologies) e condizioni di crescita consigliate dalla ditta fornitrice (American Type Culture Collection Rockville, MD).

Quando le cellule hanno raggiunto la confluenza, è stato rimosso il terreno di coltura ed è stato aggiunto il reagente commerciale TRIzol per l'estrazione dell'RNA totale.

Per la realizzazione della curva standard sono state utilizzate due piastre di coltura da 25 cm² che si trovavano all'80% di confluenza. Le piastre petri sono state lavate due volte con 5 ml di PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, Celbio) per rimuovere ogni residuo di siero e, alle cellule adese, sono state aggiunti 2 ml di tripsina 0.25% (Celbio). L'enzima proteolitico è stato attivato a 37°C per non più di 3 minuti, tempo da noi ottimizzato per staccare le cellule senza avere una degradazione del loro RNA. Dopo aver neutralizzato l'azione della tripsina con del siero fetale bovino, le cellule sono state recuperate e centrifugate a 1200 rpm per 5'. Eliminato il sovrnatante, le cellule sono state successivamente risospese in 2 ml di PBS, disgregandole completamente con una siringa apposita. Per l'eliminazione completa di eventuali residui enzimatici, le cellule sono state nuovamente centrifugate e di seguito risospese in 2 ml di PBS.

La determinazione del numero di cellule è avvenuta mediante colorazione vitale con tripan-bleu 0.4% (Sigma) utilizzando una camera di Burker. Sono state effettuate due conte, determinando una concentrazione cellulare media

di MCF-7 pari a 2×10^6 cellule/ml che ha evidenziato una completa vitalità cellulare.

5.4 Costruzione della curva standard

La linea scelta per la costruzione della curva standard è stata la linea tumorale di mammella MCF-7, nota per essere CEA mRNA positiva, ed utilizzata da altri gruppi per lo studio delle cellule tumorali circolanti nei tumori gastroenterici (61, 62).

Grazie alle caratteristiche della linea cellulare scelta, è stato possibile costruire una curva standard che permettesse di quantificare le cellule tumorali CEA positive presenti nei campioni linfonodali polmonari e di stabilire la sensibilità del metodo da noi utilizzato.

Un importante punto da precisare riguarda la scelta del metodo di quantificazione: l'impostazione dell'analisi dati, sullo strumento di Real-Time PCR, è stata settata adoperando il metodo della quantificazione assoluta verso una linea cellulare. In questo modo, il numero di cellule CEA mRNA positive riscontrate nei campioni analizzati, sono relative alla linea cellulare utilizzata.

La curva è stata ottenuta diluendo serialmente 1:10 le cellule MCF-7 in 10^6 mononucleati di donatore sano CEA negativi. I punti della curva standard così ottenuti contengono rispettivamente 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 1 cellule tumorali in 10^6 WBC (*White blood cells*).

I WBC sono stati ottenuti prelevando 10 ml di sangue da donatori sani. Per evitare una contaminazione da cellule epiteliali cutanee, CEA positive, sono stati eliminati i primi 3 ml di sangue prelevato. Le cellule mononucleate sono state isolate mediante centrifugazione per gradiente di densità (Ficoll-Histopaque-1077, Sigma) e contate come descritto nel paragrafo colture cellulari.

I campioni relativi ai punti della curva standard sono stati sottoposti ad estrazione dell'RNA totale e successivamente ad amplificazione in Real-Time RT-PCR.

5.5 Estrazione dell'RNA

L'RNA totale è stato estratto utilizzando un prodotto commerciale, il TRIzol (Life Technologies, Invitrogen), contenente una soluzione di fenolo e guanidina isotiocianato seguendo le istruzioni del protocollo specifico.

L'estrazione è stata effettuata sulla totalità del linfonodo a disposizione al fine di recuperare tutte le eventuali cellule tumorali presenti ed aumentare in questo modo la sensibilità dell'indagine.

Il tessuto è stato disgregato meccanicamente con omogenizzatore TissueLyser Qiagen in 1 ml di TRIzol. Alla fase di omogeneizzazione sono seguiti uno step di separazione delle fasi, uno di precipitazione dell'RNA ed uno di lavaggio del pellet.

Dopo aver accuratamente eliminato ogni residuo della soluzione di lavaggio, L'RNA è stato risospeso in H₂O DEPC (dietilpirocarbonato) RNasi free.

L'RNA totale estratto è stato quantificato spettrofotometricamente mediante lettura dell'assorbanza a 260 nm, in modo da procedere con la Retro-Amplificazione partendo da una concentrazione nota di RNA. È stata verificata anche la purezza dell'RNA, misurando il rapporto dei valori di densità ottica a 260 nm ed a 280 nm. Successivamente, di ogni campione è stata preparata una diluizione di 100 ng/μl, conservata a -80°C assieme all'RNA totale estratto.

Lo stesso metodo è stato utilizzato per l'estrazione dell'RNA dai punti della curva standard, saltando ovviamente la fase di omogeneizzazione.

5.6 Studio iniziale

5.6.1 Retrotrascrizione

L'RNA totale, ottenuto dai campioni, è stato retrotrascritto nel c-DNA corrispondente mediante la preparazione di una miscela di reazione contenente 10X RT Buffer, 25X dNTPs (100 Mm), 10 X RT Random primers, RNasi Inhibitor 20 U/ μ l, MultiScribeTM Reverse Transcriptase 50 U/ μ l. Tutti i reagenti utilizzati sono prodotti dalla ditta Applied Biosystems.

La reazione è avvenuta in un volume finale di 50 μ l. Per la retrotrascrizione dei campioni linfonodali è stato utilizzato 1 μ g di RNA totale. Per quanto riguarda i punti della curva standard è stato retrotrascritto sempre 1 μ g di RNA totale, ma contenente concentrazioni scalari del target d'interesse.

I campioni sono stati retrotrascritti con termociclatore 9700 (Applied Biosystems) applicando il seguente profilo termico: 25 °C per 10 min. 37 °C per 120 min., 85 °C per 5 min.

5.6.2 Primers e Probe

Un attenta analisi, utilizzando banche genomiche presenti on-line quali BLAST, ha permesso di individuare le sequenze genomiche sulle quali è stato possibile disegnare primers e probes specifici per il target di nostro interesse: il CEA mRNA. Uno studio analogo è stato effettuato anche sulla sequenza dell'mRNA per la β -actina. Grazie all'amplificazione di un gene housekeeping è infatti possibile valutare l'integrità dell'RNA analizzato. In questo modo è possibile escludere, dallo studio pilastro di questa ricerca, i campioni non valutabili in quanto degradati.

I set di primers sono stati disegnati con il software Primer Express (Applied Biosystems) utilizzando rispettivamente per il CEA mRNA e per la β -actina mRNA la sequenza trovata in banca dati numero M 17303 e X 00351.

I primers utilizzati per la β -actina mRNA amplificano un frammento di 207 bp e hanno la seguente sequenza:

Forword	5' TCC TTC CTG GGC ATG GAG 3'
Reverse	5' AGG AGG AGC AAT GAT CTT GAT CTT 3'
Sonda TaqMan™	5'-(6-FAM) CCT GTG GCA TCC ACG AAA CTA CCT TC (TAMRA)-3'

I primers utilizzati per il CEA mRNA amplificano un frammento di 182 bp ed hanno la seguente sequenza:

Forword	5' GCA AAT GCT TTA AGG AAG AAG 3'
Reverse	5' ATT CCA TAG TCA AGA GCA TCA CA 3'
Sonda TaqMan™	5'-(6-FAM) TGA AAT GAA GAA ACT ACA CCA GGG CTG CTA TAT (TAMRA)-3'

5.6.3 Quantificazione mediante TaqMan system Real-Time RT-PCR

La valutazione della concentrazione di CEA mRNA contenuta nei campioni in analisi è stata effettuata mediante interpolazione dei Ct ottenuti su di una curva di calibrazione costruita da una linea cellulare come descritto nel paragrafo 5.4.

Il primo sistema di analisi quantitativa da noi utilizzato è stato ABI PRISM 7900 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

5.6.4 Quantificazione del messaggero del CEA nei linfonodi polmonari.

La quantificazione delle cellule tumorali contenute nei campioni linfonodali è stata effettuata con il metodo della curva standard. Questo necessita di uno standard a concentrazione nota del target d'interesse; nel nostro caso il numero delle cellule tumorali CEA positive.

Aggiungendo durante la reazione di PCR diluizioni seriali di tale standard, siamo in grado di conoscere le quantità di target presente nel campione sperimentale.

Per ciascuna diluizione il ΔR_n misurato dallo strumento è in funzione del numero del ciclo di amplificazione. Il ΔR_n rappresenta la fluorescenza normalizzata emessa dal reporter, alla quale viene sottratto il valore di fluorescenza basale emesso nei primi cicli di PCR.

Graficando i valori del Ct in funzione della concentrazione del target, lo strumento genera una curva standard. Il valore del Ct è inversamente proporzionale al logaritmo della concentrazione iniziale del target (nel nostro caso il numero di cellule tumorali) presente nel campione sperimentale (35).

La quantificazione del campione sperimentale, ossia il numero di cellule tumorali contenute nel campione linfonodale, è quindi calcolato dopo amplificazione in Real-Time RT-PCR dalla regressione lineare della curva standard.

5.6.5 Reazione Di Amplificazione Quantitativa In Real Time Rt-PCR

Le reazioni di amplificazione sono avvenute mediante la preparazione di una miscela di reazione contenente: TaqMan Universal PCR Master Mix 1X, Primer Forward 0.3 μ M, Primer Reverse 0.3 μ M, Sonda TaqMan™ 0.1 μ M. Tutti i reagenti utilizzati sono prodotti dall'Applied Biosystems.

L'amplificazione della β -actina è avvenuta in 25 μ l finali di reazione: 20 μ l di master mix più 5 μ l di cDNA corrispondente. La reazione di amplificazione del CEA dei linfonodi e dei campioni della curva standard è avvenuta invece in 50 μ l finali: 30 μ l di master mix più 20 μ l di cDNA corrispondente.

Il profilo termico adottato è il seguente: 50°C per 2 min., 95°C per 10 min., a cui seguono 40 o 50 cicli rispettivamente per β -actina e CEA a 95°C per 15 sec., 60°C per 1 min.

Ogni campione sperimentale è stato amplificato in duplicato mentre la curva standard in triplicato.

5.7 Secondo studio

5.7.1 Primers e probe

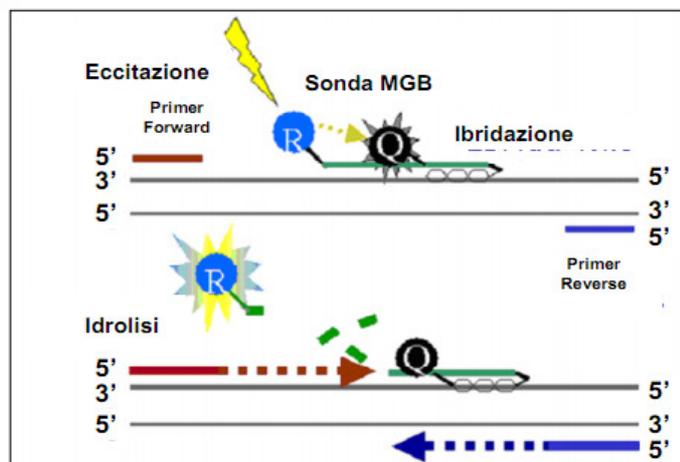
Le conoscenze scientifiche e tecniche sono sempre in continuo sviluppo, subendo repentini cambiamenti. Proprio per questo motivo è stata presa la decisione di apportare gli appropriati aggiornamenti allo studio in corso.

Come primo passo sono state apportate delle modifiche alla sequenza dei primers per il CEA mRNA.

La ricerca della miglior sequenza nucleotidica è stata eseguita con il software Primer Express (Applied Biosystems) utilizzando la sequenza trovata in banca dati numero M 17303.

I nuovi primers utilizzati per il CEA mRNA sono stati posizionati a cavallo di esoni diversi per precludere l'amplificazione del DNA genomico contaminante, eventualmente presente alla fine dell'estrazione dell'RNA. In aggiunta è stato ridotta anche la lunghezza dell'amplicone (145bp) per rendere la reazione più performante.

Per la messa a punto del saggio di Real-Time RT-PCR è stata utilizzata la chimica Taq-Man, con l'impiego di una sonda denominata MGB (Minor Groove Binder). I gruppi MGB sono molecole che derivano da antibiotici e hanno la proprietà di stabilire un legame stabile al solco minore del DNA.



Questo legame, di natura idrofobica, che si viene a creare tra la sonda MGB e il DNA, aumenta la temperatura di melting della sonda e permette, quindi, di

utilizzare sonde a sequenza più breve, con conseguente aumento di specificità del test (129).

5.7.2 Reazione Di RetroAmplificazione ONE-STEP Quantitativa In Real Time RT-PCR

Ulteriore cambiamento, rispetto allo studio iniziale, è stato il passaggio verso l'utilizzo di reazioni di RetroAmplificazione ONE-STEP. Questo ha permesso un abbattimento dei volumi di reazione, nonché della tempistica e dei costi.

Le reazioni di RetroAmplificazione ONE-STEP sono avvenute mediante la preparazione di una miscela di reazione contenente: SuperScript™ III RT/Platinum®, 2X PCR Master Mix (Invitrogen), Primer Forward, Primer Reverse (Ella Biotech), Sonda TaqMan™ MGB (Applied Biosystems). La reazione è avvenuta in 25 µl finali di reazione: 20 µl di master mix più 5 µl di RNA corrispondente a 500 ng dell'acido nucleico.

Il profilo termico adottato è il seguente: 50 °C per 15 min., 95 °C per 2 min., a cui seguono 50 cicli a 95 °C per 15 sec., 60 °C per 30 sec.

Il sistema di analisi quantitativa da noi utilizzato per questa reazione è stato ABI PRISM 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

5.7.3 Q3 Real-Time PCR

Come ultimo step di questo studio, si è voluto utilizzare un nuovo prototipo per Real-Time PCR.

Q3 viene presentato come un'innovativa piattaforma per Real-Time PCR. Nato dalla collaborazione tra ST Microelectronics e Clonit, si presenta come uno strumento Ready to Use, di piccole dimensioni (6 cm X 13 cm X 8 cm), di facile utilizzo e single-assay.



Il sistema si avvale di un microchip in silicio composto da 6 pozzetti:

- 3 pozzetti permettono l'amplificazione dei punti della cuva standard;
- 2 pozzetti sono necessari per l'amplificazione in doppio del campione d'analizzare;
- l'ultimo pozzetto è invece adibito al controllo negativo.

Il materiale di cui è composto il microchip, grazie alle sue proprietà termiche, permette inoltre di portare la miscela di reazione alle temperature necessarie per l'amplificazione del DNA. Questa caratteristica ha quindi permesso d'ingenierizzare lo strumento senza l'ausilio di un blocco termoriscaldato, semplificandone la meccanica.

In aggiunta, l'utilizzo di questa piattaforma, ha ulteriormente permesso la riduzione dei volumi di reazione (e di conseguenza i costi) da 25 μ l a 10 μ l di volume finale: 8 μ l di master mix più 2 μ l di RNA corrispondente a 200 ng dell'acido nucleico.

Le reazioni di RetroAmplificazione ONE-STEP sono avvenute adoperando la stessa miscela e profilo termico utilizzati per lo studio sul sistema SDS 7500 FAST.

6. RISULTATI

6.1 Curva Standard

La ricerca del CEA mRNA, mediante quantificazione assoluta in Real Time PCR, è stata effettuata su una casistica di 81 pazienti.

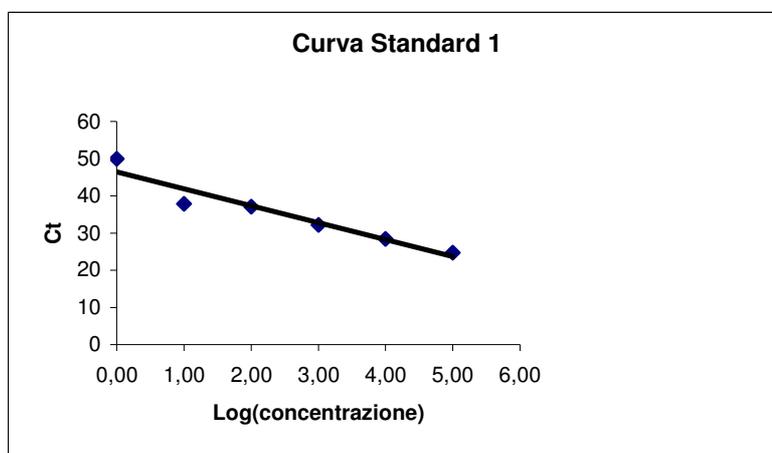
Complessivamente sono stati analizzati 305 linfonodi, utilizzando tre diverse curve di calibrazione.

Ciascuna curva standard è stata costruita diluendo serialmente da 10^5 a 1 cellula tumorale MCF-7 in 10^6 mononucleati di donatore sano.

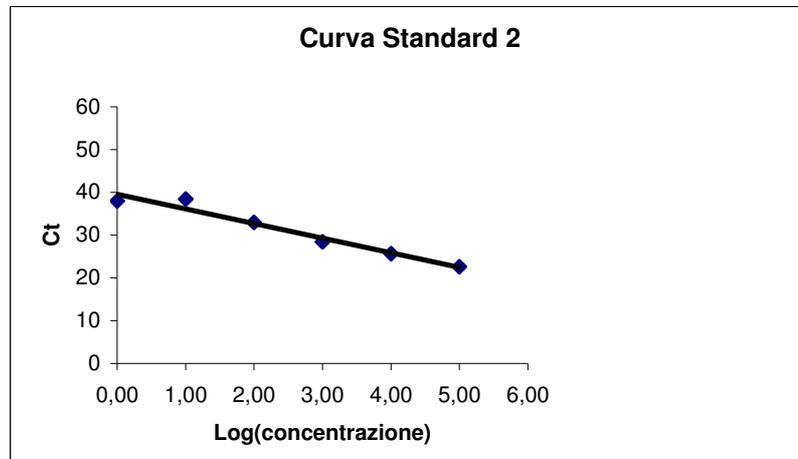
Dall'analisi di regressione lineare si è potuto verificare che l'efficienza di reazione è avvenuta nell'intorno del 100% ($\Delta=4\%$).

Di seguito i dati e i grafici relativi alle tre curve standard.

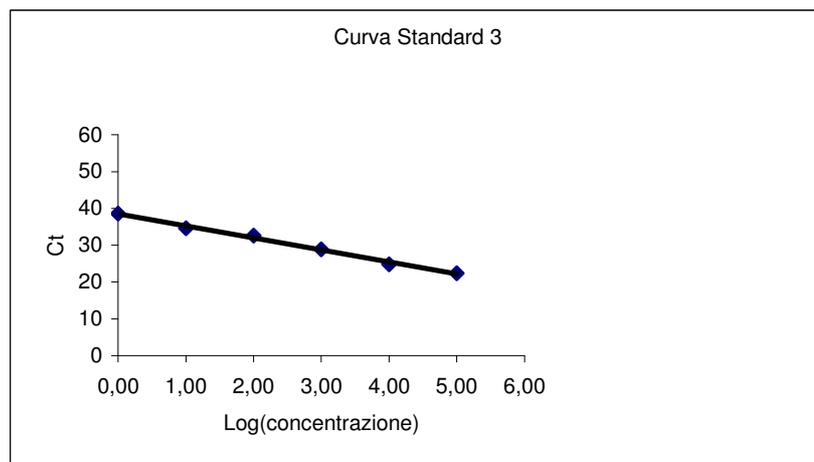
- 1) La retta di regressione lineare ha formula $y = -3.4x + 42.2$ ed ha mostrato un coefficiente di correlazione $R = 0.97$.



- 2) La retta di regressione lineare ha formula $y = -3.4x + 39.5$ ed ha mostrato un coefficiente di correlazione $R = 0.96$



- 3) La retta di regressione lineare ha formula $y = -3.2x + 38.5$ ed ha mostrato un coefficiente di correlazione $R = 0.99$



6.2 Ricerca di micrometastasi linfonodali in Pazienti NSCLC

Il numero di cellule micrometastatiche, contenute in ciascun linfonodo CEA mRNA positivo all'analisi in Real-Time PCR, è stato calcolato mediante interpolazione del suo Ct sulla curva standard. I campioni che hanno mostrato valori inferiori a 25 cellule della linea tumorale MCF-7 sono stati considerati negativi. Questo dato viene quindi considerato come il valore soglia, ossia il livello massimo di CEA mRNA riscontrato nel tessuto linfonodale non neoplastico di controllo.

Sulla base di queste osservazioni, all'analisi molecolare sono risultati positivi in totale 60 linfonodi appartenenti a 35 pazienti.

<u>Pazienti TOTALI</u> <u>Analizzati</u> <u>81</u>	PZ MOL-	PZ MOL+	TOT
PZ IST-	43 (53.1%)	15 (18.5%)	58(71.6%)
PZ IST+	3 (3.7%)	20 (24.7%)	23 (28.4%)
TOT	46(56.8%)	35(43.2%)	81

Il confronto tra i risultati ottenuti dalle valutazioni molecolari e istologiche degli stessi pazienti ha permesso di constatare che in 15 di essi (18.5%) l'indagine molecolare ha consentito l'identificazione di metastasi non individuate all'esame istopatologico routinario. Per contro, l'esame al microscopio ottico ha rilevato morfologicamente metastasi in 3 pazienti (3.7%) che hanno mostrato livelli quantitativi di CEA mRNA inferiori al valore soglia precedentemente definito.

La differente capacità diagnostica delle due metodiche è stata sottoposta ad analisi statistica. Effettuando il test del chi quadrato è stato possibile verificare che esiste una differenza statisticamente significativa tra le due metodiche ($p < 0,05$).

6.2.1 Valutazione dei pazienti istologicamente N0

Sono stati valutati 58 casi (71.6%) di NSCLC istologicamente classificati come N0, per un totale di 222 linfonodi analizzati.

L'analisi molecolare ha permesso di rilevare in 21 linfonodi, appartenenti a 15 pazienti, la presenza di cellule tumorali micrometastatiche. Pertanto, nei risultati ottenuti si è verificata una discordanza tra diagnosi istologica e molecolare nel 26% dei casi, mentre si è ottenuta una concordanza diagnostica in 43 casi (74%).

<u>PAZIENTI N0</u> <u>58 (71.6% sul tot pz)</u>	PZ MOL-	PZ MOL+
PZ IST-	43(74.1%) (53.1% sul tot pz)	15 (25.9%) (18.5% sul tot pz)

Sottoponendo ad analisi statistica i risultati relativi alla sola casistica N0, è stato possibile verificare che, i risultati forniti dall'indagine molecolare, in Real-Time RT-PCR, presentano una differenza statisticamente significativa rispetto ai dati raccolti mediante le metodiche routinarie ($P < 0,01$).

6.2.2 Valutazione dei pazienti istologicamente N1

Nella casistica in studio sono stati valutati 10 pazienti (12.3%) istologicamente classificati come N1.

<u>PAZIENTI N1</u> <u>10 (12,3% sul tot pz)</u>	PZ MOL-	PZ MOL+
PZ IST+	3 (30%) (3.7% sul tot pz)	7(70%) (8.6% sul tot pz)

La valutazione in Real Time RT-PCR ha consentito di verificare in 7 casi (70%) una concordanza diagnostica. Nei rimanenti 3 casi (30%) non si sono riscontrate cellule micrometastatiche all'analisi molecolare.

L'analisi statistica, mediante il test del chi quadrato, ha permesso di verificare che la discordanza tra le due metodiche non è statisticamente significativa ($P > 0,05$).

6.2.3 Valutazione dei pazienti istologicamente N2

Nella presente casistica sono stati valutati 13 pazienti (16.1%) classificati istologicamente N2.

<u>PAZIENTI N2</u> <u>13 (16,1% sul tot pz)</u>	PZ MOL-	PZ MOL+
PZ IST+	0 (0%)	13 (100%) (16.05% sul tot pz)

L'esame molecolare ha identificato per tutti i casi N2 la presenza di micrometastasi in linfonodi mediastinici, determinando una completa concordanza diagnostica con l'analisi microscopica convenzionale.

6.3 Valutazione pazienti con recidiva

Il monitoraggio continuo dei pazienti, dopo resezione chirurgica del tumore primario, ha permesso di appurare i casi che hanno presentato un esito finale sfavorevole: la presenza di recidiva.

Nella presente casistica, 29 pazienti (35,8%) hanno mostrato una ricaduta della malattia in un periodo variabile da 4 a 50 mesi dopo l'intervento chirurgico. I restanti 52 pazienti NSCLC (64.2%) hanno avuto un decorso clinico favorevole.

<u>Casistica Totale</u> <u>81pz</u>	PZ N0	PZ N1	N2
Pazienti Recidiva	24 (29.6%)	3 (3.7%)	2 (2.5%)
Pazienti Liberi	34 (42%)	7 (8.6%)	11 (13.6%)

Sulla base di quanto riportato nella tabella precedente, si può osservare che la maggior parte dei pazienti con ricaduta appartiene alla casistica istologicamente libera da micrometastasi.

Tenendo presente che i pazienti risultati positivi, all'analisi istopatologica, vengono sottoposti a terapie più aggressive rispetto alla controparte negativa, risulta essere rafforzato il dato che indica una minor incidenza di recidiva nei pazienti stadiati N1 e N2.

6.3.1 Valutazione di recidiva nella casistica istologicamente N0

Riponendo l'attenzione sulla casistica risultata negativa all'analisi istopatologica, sono stati osservati 24 pazienti che hanno presentato recidiva, mentre 34 non hanno mostrato ripresa della malattia.

<u>PAZIENTI N0</u>	PZ MOL+	PZ MOL-	Tot
Pazienti Recidiva	13 (22,4%)	11 (19%)	24 (41.4%)
Pazienti Liberi	2 (3,4%)	32 (55,2%)	34 (58.6%)
Tot	15 (25,8%)	43 (74,2%)	<u>58</u>

Grazie all'impiego di metodiche molecolari, la ricerca del CEA mRNA ha permesso di individuare 13 pazienti su 24 (54,2%), presentanti recidiva, che l'analisi istopatologica non era stata in grado di rilevare. Mentre 2 casi, risultati positivi all'analisi molecolare, non hanno presentato una ricaduta di malattia.

Da questi dati risulta che l'87% dei casi (13 pazienti su 2), risultati positivi all'analisi molecolare, hanno avuto una prognosi sfavorevole.

6.3.2 Valutazione di recidiva nella casistica istologicamente N1 e N2

Considerando i 10 pazienti istologicamente stadiati N1, si può notare che solo 3 pazienti (30%) sono andati incontro a recidiva, mentre 7 pazienti (70%) hanno avuto un decorso clinico favorevole.

<u>PAZIENTI N1</u>	PZ MOL+	PZ MOL-	Tot
Pazienti Recidiva	2 (20%)	1 (10%)	3 (30%)
Pazienti Liberi	5 (50%)	2 (20%)	7 (70%)
Tot	7 (70%)	3 (30%)	<u>10</u>

Analizzando unicamente i pazienti istologicamente N2, verificiamo un andamento simile alla casistica N1: solo 2 pazienti (15,4%) su 13 hanno avuto una prognosi sfavorevole.

<u>PAZIENTI N2</u>	PZ MOL+	PZ MOL-	Tot
Pazienti Recidiva	2 (15,4%)	0	2 (15,4%)
Pazienti Liberi	11 (84,6%)	0	11 (84,6%)
Tot	13 (100%)	0	<u>13</u>

6.3.3 Valutazione di recidiva nella casistica molecolarmente positiva

Focalizzando l'attenzione sui casi positivi per il CEA mRNA, si può osservare che 17 pazienti (48,6%) sono andati incontro a recidiva, mentre il 51,4% (18 pazienti) non ha mostrato ripresa di malattia.

<u>35 pazienti MOL+</u>	PZ MOL+ RECIDIVA	PZ MOL+ LIBERI REC	TOT
PZ N0	13 (37,2%)	2 (5,7%)	15 (42,9%)
PZ N1	2 (5,7%)	5 (14,3%)	7 (20%)
PZ N2	2 (5,7%)	11 (31,4%)	13 (37,1%)
TOT	17 (48.6%)	18 (51.4%)	35

La tendenza a recidiva risulta essere maggiormente presente nei pazienti istologicamente negativi (13 casi su 15) rispetto alla controparte positiva (4 casi su 20).

Mediante analisi statistica con il test del chi quadrato, si ottiene che questa differenza è statisticamente significativa ($P < 0,01$), per cui i pazienti istologicamente N0 mostrano una tendenza maggiore a recidivare.

6.3.4 Valutazione del tempo di recidiva verso quantitativo di
CEA mRNA

Analizzando la casistica risultata positiva per il CEA mRNA si è osservato un tempo medio di recidiva di 16.8 mesi.

Casi CEA mRNA positivi	Valutazione istopatologica	CT CEA medio	RECIDIVA
1	N0	33,69	7 mesi
2	N2	29.88	-
3	N0	37.05	7 mesi
4	N0	30.33	6 mesi
5	N1	32.74	-
6	N0	34.10	40 mesi
7	N0	36.07	16 mesi
8	N2	35.95	-
9	N1	27.82	4 mesi
10	N0	34.24	7 mesi
11	N0	36.52	15 mesi
12	N2	28.65	-
13	N1	33.53	-
14	N1	36.25	31 mesi
15	N0	34.05	50 mesi
16	N1	30.19	-
17	N0	33.81	8 mesi
18	N2	27.83	-
19	N2	22.12	-
20	N2	31.34	9 mesi
21	N2	27.18	-
22	N0	37.21	12 mesi
23	N2	32.09	10 mesi
24	N2	34.21	-
25	N0	36.01	-

Casi CEA mRNA positivi	Valutazione istopatologica	CT CEA medio	RECIDIVA
26	N0	36,39	-
27	N0	33,68	9 mesi
28	N2	36,05	-
29	N2	31,97	-
30	N0	34,35	26 mesi
31	N2	32,98	-
32	N1	33,13	40 mesi
33	N2	28,51	-
34	N0	32,79	6 mesi
35	N1	36,68	-

Avendo a disposizione un dato quantitativo dell'espressione del CEA mRNA, abbiamo voluto verificare se la prognosi dei pazienti, la cui analisi molecolare ha mostrato valori di Ct alti, fosse diversa dalla controparte con valori di Ct bassi.

Calcolato il Ct medio per il CEA mRNA (Ct medio=33,96), la casistica CEA mRNA positiva, che ha presentato recidiva, è stata quindi suddivisa in due sottogruppi:

- Casi con Ct > 33,96;
- Casi con Ct < 33,96.

Casi CEA mRNA Positivi <u>Ct < 33,96.</u>	Valutazione istopatologica	CT CEA medio	RECIDIVA
1	N0	33,69	7 mesi
2	N0	30,33	6 mesi
3	N1	27,82	4 mesi
4	N0	33,81	8 mesi
20	N2	31,34	9 mesi
23	N2	32,09	10 mesi
27	N0	33,68	9 mesi
32	N1	33,13	40 mesi
34	N0	32,79	6 mesi
Media	-	32.07	7.6 mesi

Casi CEA mRNA Positivi <u>Ct> 33,96;</u>	Valutazione istopatologica	CT CEA medio	RECIDIVA
3	N0	37,05	7 mesi
6	N0	34,1	40 mesi
7	N0	36,07	16 mesi
10	N0	34,24	7 mesi
11	N0	36,52	15 mesi
14	N1	36,25	31 mesi
15	N0	34,05	50 mesi
22	N0	37,21	12 mesi
30	N0	34,35	26 mesi
Media	-	35.53	22.6 mesi

I pazienti che hanno mostrato valori di Ct inferiori a 33,96 hanno avuto una pronosi peggiore, con una media di 7,6 mesi. Contrariamente, i pazienti con valori di Ct superiori a 33,96 hanno avuto una prognosi migliore, con una media di 22,6 mesi.

L'analisi statistica, mediante t-student, ha permesso di verificare che l'elevato quantitativo di CEA mRNA (Ct<33,96) riscontrato nei linfonodi locoregionali è correlabile con una prognosi peggiore ($p<0,01$).

6.4 Ristadiazione su base molecolare

I dati raccolti mediante lo studio in Real Time RT-PCR hanno permesso di effettuare una nuova valutazione della stadiazione dei pazienti in esame.

Prendendo in considerazione i linfonodi locoregionali risultati positivi all'analisi molecolare, e utilizzando lo schema presente a pagina 48, è stato possibile ristadiare i pazienti in base alla stazione linfonodale colpita da micrometastasi.

	PZ N1 MOL	PZ N2 MOL	TOTALE
PZ N0 IST	5 (6.2%)	10 (12.3%)	15 (18.5%)
PZ N1 IST	0	6 (7.4%)	6 (7.4%)
TOTALE	5 (6.2%)	16 (19.7%)	21 (25.9%)

Su 35 casi, risultati positivi al CEA mRNA, sono stati ristadiati 21 pazienti (25.9% della casistica complessiva). Di questi, 5 casi sono passati dallo stadio N0 allo stadio N1, 10 casi dallo stadio N0 allo stadio N2 e 6 casi sono passati dallo stadio N1 allo stadio N2. Su un caso N1, pur avendo rilevato micrometastasi linfonodali, la sede del linfonodo non ha influito sulla ristadiazione.

6.4.1 Recidiva verso ristadiatione molecolare

Grazie alla ristadiatione tumorale, effettuata mediante analisi molecolare, è stato possibile correlare, ai casi che hanno presentato recidiva, un numero maggiore di pazienti positivi alle micrometastasi linfonodali. Il 60% dei pazienti, risultati positivi per la ricerca del CEA mRNA, hanno presentato recidiva, mentre i pazienti liberi da malattia sono andati incontro a recidiva nel 20% dei casi.

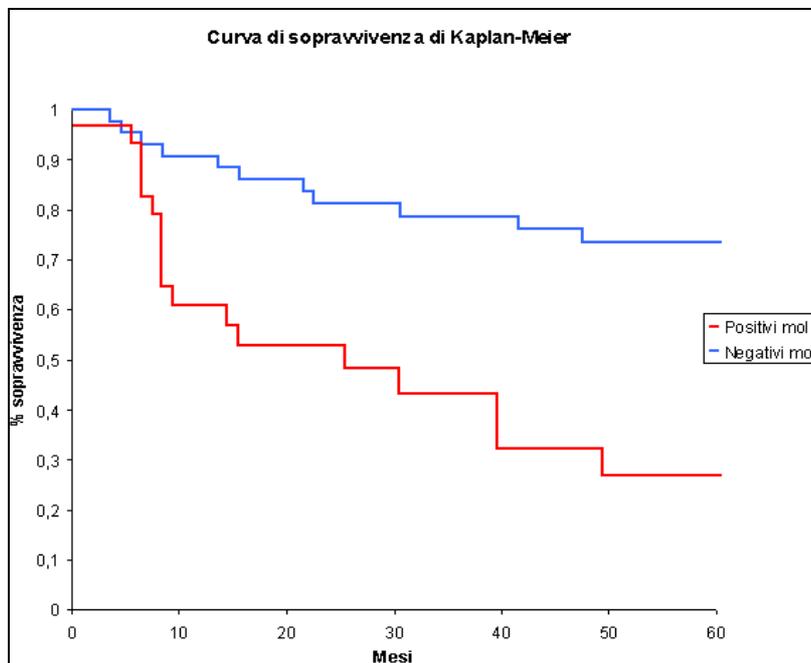
	<u>Casistica molecolare</u> <u>Positiva 35pz</u>	<u>Casistica molecolare</u> <u>Negativa 46pz</u>
Pazienti Recidiva	20 (60%)	9 (20%)
Pazienti Liberi	15 (40%)	37 (80%)

Nella valutazione finale della casistica possiamo quindi identificare solo 9 pazienti, negativi per le micrometastasi (contro i 24 casi iniziali), che hanno presentato recidiva.

I pazienti risultati positivi alle micrometastasi, mediante indagine molecolare, tendono maggiormente ad avere recidiva rispetto alla controparte negativa ($p < 0.01$).

<u>Casistica Totale</u> <u>81pz</u>	PZ N0 MOL	PZ N1 MOL	PZ N2 MOL
<u>Pazienti Recidiva</u>	9 (11.1%)	5 (6.2%)	15 (18.5%)
Pazienti Liberi	34 (42%)	3 (3.7%)	15 (18.5%)

L'analisi di sopravvivenza mediante il metodo di Kaplan-Meier ha permesso di verificare che la differenza di sopravvivenza, tra i pazienti molecolarmente positivi e negativi, è statisticamente significativa. (log rank test = 20,84, $p < 0,01$).



Esaminando il grafico si può osservare che le aspettative di vita, per i pazienti con micrometastasi linfonodali, sono del 27% dopo 5 anni dall'intervento chirurgico. Per quanto riguarda i pazienti risultati negativi, la probabilità di sopravvivenza si alza a 73% dopo 5 anni dalla chirurgia.

6.5 Analisi Molecolare RetroAmplificazione

ONE-STEP 7500 FAST

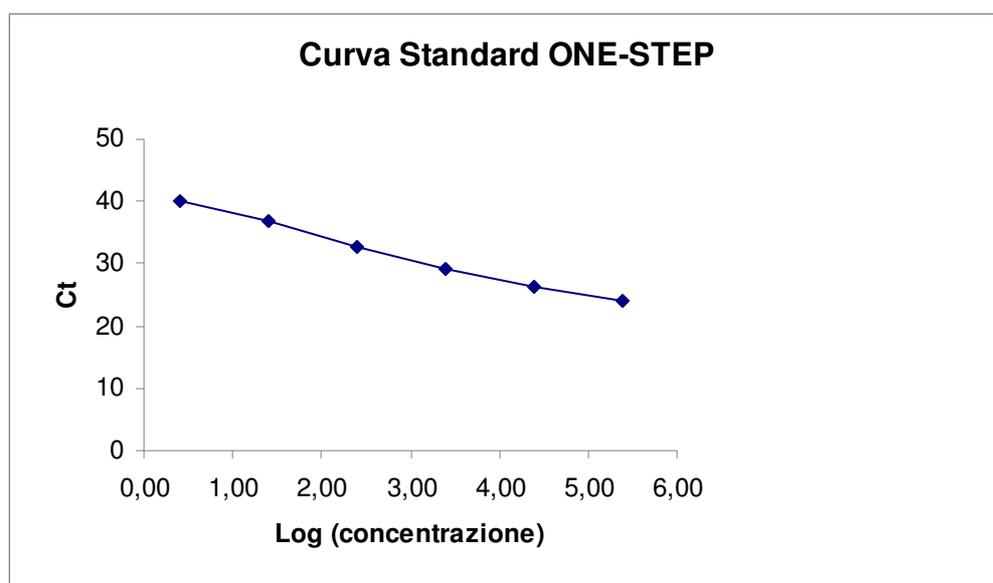
La valutazione molecolare del CEA mRNA, tramite RetroAmplificazione ONE-STEP sul sistema SDS 7500 FAST, ha preso in considerazione 8 linfonodi locoregionali risultati positivi mediante reazione classica (RetroTrascrizione e Amplificazione) e 4 linfonodi negativi.

Campioni	Reazione CLASSICA	Reazione ONE-STEP
1 - 79LN8	Positivo	Positivo
2 - 87LN7	Positivo	Positivo
3 - 79LN9	Negativo	Negativo
4 - 87LN8	Positivo	Positivo
5 - 87LN9	Positivo	Positivo
6 - 84LN4	Negativo	Negativo
7 - 81LN3	Positivo	Positivo
8 - 85LN2	Negativo	Negativo
9 - 81LN4	Negativo	Negativo
10 - 81LN7	Positivo	Positivo
11 - 81LN10	Positivo	Positivo
12 - 83LN10	Positivo	Positivo

L'indagine molecolare mediante RetroAmplificazione ONE-STEP ha mostrato una completa concordanza positiva/negativa con lo studio precedente.

La quantificazione assoluta, rispetto alla linea cellulare MCF-7, è avvenuta interpolando i valori di Ct di ciascun linfonodo sulla rispettiva curva standard.

L'analisi dei punti curva standard mediante la nuova miscela di reazione ha permesso di ottenere una retta di regressione lineare con la seguente formula: $y = -3.3x + 41.0$ ed ha mostrato un coefficiente di correlazione $R = 0.99$.



La quantificazione del numero di cellule, risultate positive per il CEA mRNA mediante la nuova metodica, ha permesso di confermare la sensibilità del metodo: valutando il quantitativo di cellule positive, identificate con la nuova metodica rispetto alla reazione classica, lo studio statistico non ha rilevato differenze statisticamente significative ($P > 0,4$).

Campioni	Reazione CLASSICA n.cell	Reazione ONE-STEP n.cell
1 - 79LN8	29	1502
2 - 87LN7	30659	13946
3 - 87LN8	101	150
4 - 87LN9	112	1469
5 - 81LN3	5898	22597
6 - 81LN7	27	31
7 - 81LN10	3135	2870
8 - 83LN10	33	75

6.6 Analisi Molecolare RetroAmplificazione ONE-STEP Q3 Real-Time PCR

Con lo scopo di verificare l'autentica capacità diagnostica di un nuovo prototipo per Real-Time PCR, Q3, è stato avviato uno studio per comparare i risultati ottenuti sui due strumenti Applied Biosystem con quelli forniti dal nuovo strumento.

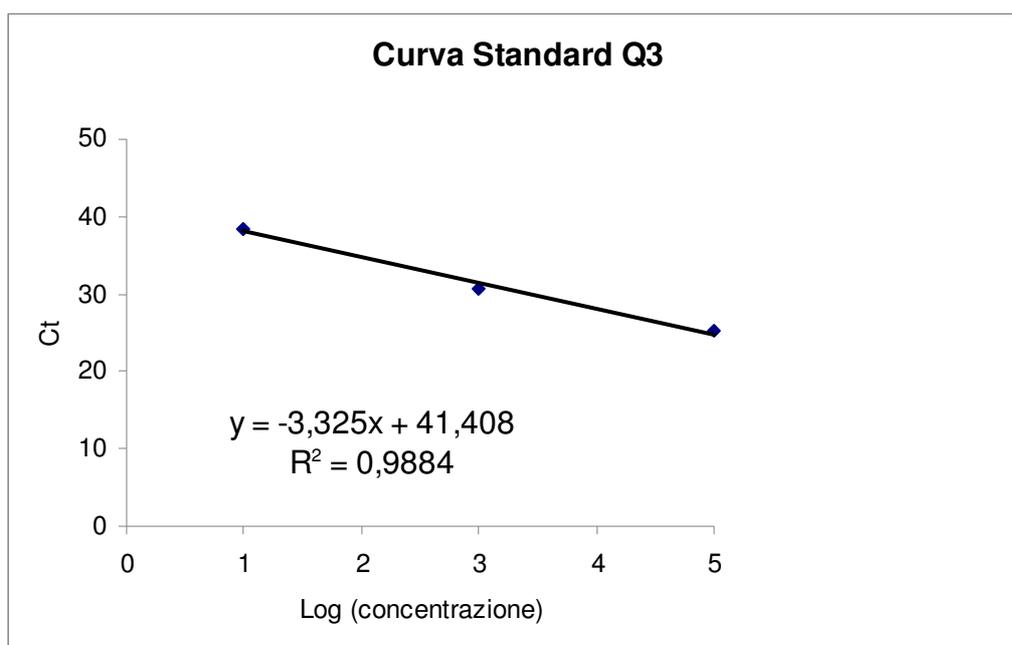
Sono stati inizialmente valutati 4 linfonodi risultati positivi per il CEA mRNA e 4 linfonodi negativi.

Campioni	Applied Biosystem	Q3
1 – 79LN9	Negativo	Negativo
2 – 87LN7	Positivo	Positivo
3 – 84LN4	Negativo	Negativo
4 – 85LN2	Negativo	Negativo
5 – 81LN3	Positivo	Positivo
6 – 81LN4	Negativo	Negativo
7 – 81LN7	Positivo	Positivo
8 – 81LN10	Positivo	Positivo

La ricerca di micrometastasi linfonodali, utilizzando la nuova piattaforma per Real-Time PCR, ha mostrato una completa concordanza positiva/negativa con le analisi effettuate sugli strumenti Applied Biosystems.

La quantificazione assoluta del numero di cellule tumorali presenti nei linfonodi analizzati non ha mostrato una perfetta correlazione con i risultati precedentemente ottenuti. I dati hanno mostrato una maggior variabilità, ma pur sempre restando nell'intorno dell'errore sperimentale dello strumento stesso: $\frac{1}{2}$ logaritmo della concentrazione osservata.

Ogni campione, testato in duplicato, è stato sottoposto a quantificazione assoluta, utilizzando la propria curva standard costruita su 3 punti (10^5 , 10^3 , 10 cellule MCF-7 in 10^6 mononucleati di donatore sano).



Di seguito i valori delle concentrazioni osservate relative ai tre strumenti utilizzati:

Campioni	AB 7900 n.cell	AB 7500 n.cell	ST Q3 n.cell
2 - 87LN7	30659	13946	8602
5 - 81LN3	5898	22597	172131
7 - 81LN7	27	31	30
8 - 81LN10	3135	2870	29495

L'analisi statistica non ha mostrato differenze statisticamente significative per i risultati ottenuti mediante le tre diverse piattaforme per Real-Time PCR ($P > 0,1$).

7. DISCUSSIONE RISULTATI

7.1 Scelta dello studio

I tumori maligni del sistema respiratorio rappresentano le neoplasie più diffuse nei paesi sviluppati.

Come già discusso ampiamente nell'introduzione, il presente lavoro è stato indirizzato sullo studio dei carcinomi polmonari NSCLC, rappresentanti la forma più aggressiva e con maggior incidenza (80%).

Il motivo fondamentale, che ci ha spinto in questa direzione, è stato l'alto numero di casi NSCLC che sono spesso rilevati in uno stadio avanzato di malattia, motivo principale di un decorso clinico sfavorevole.

La causa del ridotto tasso di sopravvivenza per questa patologia potrebbe essere attribuita alla mancanza di un test diagnostico, in grado di identificare i pazienti affetti da NSCLC ai primi stati di sviluppo. In aggiunta, l'individuazione di metastasi nei linfonodi locoregionali risulta essere il più importante fattore di rischio, in quanto la presenza di micrometastasi è associata ad una maggior ripresa della malattia.

Quanto riportato risulta essere indubbiamente uno dei problemi socio-sanitari più preoccupanti dei nostri giorni. Proprio per questo motivo, è stata presa la decisione di intraprendere uno studio atto a valutare una metodica in grado di permettere una più corretta e precisa stadiazione linfonodale, necessaria per migliorare il tasso di sopravvivenza dei pazienti.

7.2 Scelta della Metodica

Accurate analisi di follow-up hanno permesso di individuare un'alta percentuale di pazienti che hanno presentato ricaduta di malattia, pur essendo risultati negativi per micrometastasi linfonodali. Questo ha permesso di constatare un'inadeguatezza nelle procedure standard diagnostiche.

La ricerca delle cellule tumorali, nei linfonodi locoregionali, viene attualmente effettuata attraverso l'analisi istopatologica di un numero limitato di sezioni, fattore limitante che porterebbe alla diagnosi di falsi negativi.

Un aiuto in questo campo potrebbe essere dato dalle nuove tecniche di indagine molecolare che, grazie alla scoperta di nuovi marcatori tumorali, potrebbero mostrarsi come tecniche maggiormente sensibili, meno costose e molto più veloci.

Attualmente, tecniche quali la PCR, sono comunemente applicate nella rilevazione di micrometastasi linfonodali nei tumori maligni (66, 67).

Sulla base delle problematiche scaturite abbiamo scelto la Real Time RT-PCR come approccio metodologico per le seguenti ragioni:

- 1- grazie alla Real-Time PCR è possibile ricercare, nell'intero linfonodo, l'mRNA di marcatori molecolari specifici per la neoplasia di interesse, eliminando il fattore limitante dell'indagine istopatologica;
- 2- risulta essere la tecnica che, rispetto all'immunoistochimica e alla RT-PCR standard, ha mostrato maggior sensibilità (10 cellule tumorali in 10^6 mononucleati normali), permettendo una riduzione dei risultati falsamente negativi;
- 3- determina una riduzione sostanziale dei tempi d'analisi, maggiormente abbattuti se si sceglie di impostare una reazione di RetroAmplificazione One-Step.
- 4- permette una diminuzione dei volumi di reazione, e di conseguenza un abbattimento dei costi, grazie all'impiego di nuovi enzimi ingegnerizzati per essere maggiormente efficienti.
- 5- Determina una maggior riproducibilità dei risultati, sia di quelli ottenuti da repliche di uno stesso campione effettuate in una corsa di amplificazione (riproducibilità intrasaggio) che tra quelli ottenuti da corse diverse (riproducibilità intersaggio);

- 6- riduce il rischio di cross-contaminazioni grazie all'eliminazione delle manipolazioni che si rendono necessarie per rilevare gli amplificati su gel d'agarosio contenente bromuro di etidio;
- 7- permette di verificare la qualità dell'RNA estratto sulla base del Ct di un reference endogeno;
- 8- consente di quantificare il target d'interesse (nel nostro caso il CEA mRNA). Ciò ha reso possibile settare un cut-off di espressione che discriminasse i livelli fisiologici di CEA mRNA da quelli patologici;
- 9- riduce risultati falsamente positivi grazie alla capacità di discriminare un'espressione fisiologica del marcatore d'interesse da quella patologica;

7.3 Scelta del marcatore

La decisione di utilizzare, come marcatore per la rilevazione di micrometastasi linfonodali, l'mRNA del CEA è sopraggiunta dopo attenta ricerca bibliografica che, descriveva il CEA mRNA, come un marcatore molecolare con un ruolo significativo nell'identificazione delle micrometastasi tumorali. Infatti, come membro della superfamiglia delle immunoglobuline, il CEA risulta essere coinvolto nel riconoscimento e nell'adesione intercellulare, facilitando in questo modo il processo di metastatizzazione (3). In aggiunta, pazienti con elevati livelli sierici di CEA, sono stati indicati avere una maggior invasione vascolare e permeazione linfatica (6), permettendo al CEA di candidarsi come fattore influenzante lo sviluppo di micrometastasi.

Sulla base di quest' attenta valutazione e, in considerazione del fatto che le neoplasie della nostra casistica esprimevano il CEA, abbiamo scelto questo marcatore per indagare la presenza di micrometastasi nei linfonodi polmonari locoregionali di pazienti NSCLC.

7.4 Valutazione delle curve standard di calibrazione

La quantificazione di un target (nel nostro caso il CEA mRNA) in Real-Time PCR necessita la costruzione di una curva di calibrazione. La scelta per la costruzione della curva standard è caduta sulla linea cellulare MCF-7 poiché, in letteratura, è nota essere CEA mRNA positiva (130), dato confermato anche dal presente studio.

Sulla base di quanto descritto ne consegue che i punti curva standard, utilizzati per la quantificazione assoluta, non contengono un numero noto di copie di CEA mRNA, ma una quantità nota di cellule MCF-7.

Per ogni campione che costituisce un punto della curva standard, l'analisi in Real-Time RT-PCR ha riportato su grafico il Ct del CEA mRNA in funzione della quantità di cellule MCF-7 presenti.

Il grafico ottenuto ci ha permesso di:

- 1- estrapolare il numero di cellule tumorali, relative alla linea MCF-7, contenute in un campione linfonodale risultato positivo per il CEA mRNA;
- 2- discriminare i livelli fisiologici di espressione per il CEA mRNA (25 cellule MCF-7) da quelli fortemente indicativi di uno stato patologico;
- 3- di stabilire la sensibilità del nostro metodo nell'identificazione di micrometastasi: 10 cellule tumorali MCF-7 in 10^6 cellule mononucleate.

Ogni sessione d'analisi è stata eseguita con la propria curva standard di calibrazione e, dall'analisi di regressione lineare, si è potuto verificare che l'efficienza di reazione è avvenuta nell'intorno del 100% ($\Delta=4\%$).

7.5 Valutazione dell'integrità dei campioni

L'RNA totale, estratto da ogni diluizione seriale della linea MCF-7, come l'RNA di tutti i campioni linfonodali in studio, è stato testato per valutare l'adeguatezza dei campioni.

Grazie alle precedenti esperienze, la valutazione di un reference endogeno (beta-actina), ossia di un gene costitutivamente espresso, ha permesso l'individuazione di campioni con una possibile degradazione dell'RNA.

In riferimento alle quantità di RNA sottoposte alle nostre indagini (100 ng) abbiamo notato che, l'analisi mediante Real-Time RT-PCR, determina Ct > di 23 per campioni che hanno mostrato una degradazione dell'RNA alla valutazione mediante elettroforesi su gel d'agarosio denaturante.

Sulla base di queste informazioni, sono stati quindi presi in considerazione unicamente i campioni linfonodali che presentavano valori di Ct < 23, in quanto la presenza di RNA degradato avrebbe potuto dare risultati falsamente negativi.

7.6 Valuazione della ricerca di micrometastasi linfonodali in Pazienti

NSCLC

La costruzione della curva standard ha permesso di settare il cut-off di positività a 25 cellule MCF-7. Sulla base di questo valore, è stata ricercata la presenza di micrometastasi in 305 linfonodi locoregionali appartenenti a 81 pazienti della casistica NSCLC.

All'analisi molecolare sono risultati positivi in totale 60 linfonodi appartenenti a 35 (43,2%) pazienti e così distribuiti: 15 casi (18,5%) risultati istopatologicamente negativi e 20 (24,7%) istologicamente positivi (7 pazienti N1 e 13 pazienti N2).

L'indagine molecolare ha quindi permesso di individuare il 18,5% in più di micrometastasi non individuate all'esame istopatologico routinario. Questo dato ha permesso di dimostrare un reale aumento di sensibilità, della nuova metodica, in campo diagnostico ($P < 0,05$).

Solo 3 pazienti su 81 (3,7%) sono risultati negativi per la ricerca del CEA mRNA nonostante un esito positivo alla valutazione morfologica. Questa discordanza non risulta però essere statisticamente significativa ($p > 0,05$). Una spiegazione attendibile per questi 3 esiti negativi potrebbe ricadere sulla disomogenea distribuzione della metastasi nel linfonodo, o da un errore nel campionamento del tessuto.

Valutando quanto riportato emerge che la valutazione del CEA mRNA, mediante Real-Time RT-PCR, può essere un valido strumento di supporto all'analisi morfologica per una migliore definizione dello stato linfonodale dei pazienti con NSCLC sottoposti a chirurgia.

7.7 Valutazione del significato prognostico del CEA mRNA nei pazienti con micrometastasi

La presenza di un follow-up costantemente aggiornato ha permesso di individuare 29 pazienti (35,8%) che hanno presentato una ricaduta di malattia. Osservando l'esito istopatologico di questi casi è stato constatato che l'83% (24 pazienti) apparteneva alla casistica N0, dato che suggerisce un'inadeguatezza dei metodi diagnostici adottati abitualmente. Per contro, dei 29 pazienti con recidiva, solo 5 casi (17%) sono risultati istologicamente positivi.

La bassa percentuale di recidiva, in questi pazienti, può essere spiegata correlando l'esito positivo (istologico) per micrometastasi a una terapia intensiva postintervento con l'ausilio di farmaci chemioterapici, che spiegherebbe la minor incidenza di recidiva.

Focalizzando l'attenzione sui 15 casi istologicamente N0, risultati positivi alla ricerca del CEA mRNA mediante Real-Time PCR, è stato possibile verificare che l'87% di questi pazienti (13 su 15) ha avuto un decorso clinico sfavorevole. Questa osservazione risulta essere a favore della metodica molecolare, mostrando la sua capacità nel diagnosticare pazienti realmente positivi per micrometastasi linfonodali.

Abbiamo quindi valutato se la frequenza nella comparsa di recidiva fosse in rapporto con l'identificazione delle micrometastasi in Real-Time RT-PCR mediante la valutazione del CEA mRNA.

Le curve di sopravvivenza, graficate seguendo il metodo di Kaplan-Meier, e relative alla comparsa di recidive nella casistica oggetto del nostro studio (vedi grafico pag. 78), mostrano che i pazienti con micrometastasi linfonodali tendono a recidivare maggiormente rispetto alla controparte negativa ($p < 0.01$). Precisamente è stato constatato che il 60% dei pazienti, risultati positivi per la ricerca del CEA mRNA, ha avuto recidiva, mostrando un'aspettativa di sopravvivenza del 27% dopo 5 anni dalla rimozione chirurgica del tumore primario. Per contro, i pazienti con esito molecolare negativo hanno mostrato recidiva nel 20% dei casi, con un tasso di sopravvivenza del 73% dopo 5 anni dall'intervento chirurgico.

Facendo riferimento alla bassa percentuale di recidiva nei pazienti istologicamente positivi (17%), ne consegue che, una corretta diagnosi porta a una terapia adeguata allo stato di malattia del paziente, abbassandone il rischio di morte. Per cui, adottando il nuovo metodo diagnostico molecolare, si potrebbe individuare un maggior numero di pazienti a rischio, aumentandone le aspettative di vita.

7.7.1 CEA mRNA e tempo di recidiva

Essendo noto il coinvolgimento del CEA nei processi di metastatizzazione, è stato indagato se i pazienti con elevati livelli di CEA mRNA (Ct bassi) avessero una prognosi peggiore rispetto alla controparte con Ct alti (bassi livelli di CEA mRNA).

Dopo aver calcolato il Ct medio di uscita per il target d'interesse (33.96), la casistica molecolarmente positiva è stata suddivisa in due gruppi: Ct < 33.96 e Ct > 33.96.

L'analisi dei rispettivi tempi di recidiva ha mostrato quanto segue: i pazienti con elevati livelli di CEA mRNA hanno mostrato un tempo medio di recidiva minore (7.6 mesi) rispetto ai pazienti con un quantitativo inferiore di CEA mRNA (22.6 mesi). Ne consegue che l'elevato quantitativo di CEA mRNA, riscontrato nei linfonodi locoregionali, è correlabile con una prognosi peggiore

($p < 0.01$). Questo dato ben concorda con quanto riportato in letteratura, rimarcando il coinvolgimento del CEA nei processi di metastatzzazione e confermandone la bontà come marcatore per la ricerca di micrometastasi. In aggiunta, i livelli di espressione del CEA mRNA potrebbero essere utili per individuare i pazienti a maggior rischio di ricaduta, permettendo di valutare eventuali terapie più aggressive per sconfiggere la malattia residua.

7.8 Ristadiazione su base molecolare

Supportati dai risultati ottenuti mediante analisi in Real Time RT-PCR per l'identificazione delle micrometastasi, abbiamo voluto osservare come questa metodica abbia influito sulla diagnosi istologica. Prendendo in considerazione i linfonodi locoregionali risultati positivi all'analisi molecolare è stato possibile ristadiare i pazienti in base alla stazione linfonodale colpita da micrometastasi.

Nei pazienti istologicamente N0 abbiamo osservato una discordanza nella diagnosi (istologica *versus* molecolare) nel 25.9% (15 pazienti su 58). Di questi, 5 casi sono passati dallo stadio N0 allo stadio N1, mentre 10 casi sono passati dallo stadio N0 allo stadio N2.

Nei pazienti N1 abbiamo riscontrato il 90% di discordanza nella diagnosi: 3 pazienti sono risultati negativi all'indagine molecolare (dato non statisticamente significativo. Vedi par 7.6); per 6 casi, la nuova analisi ha determinato il passaggio allo stadio N2, mentre per 1 paziente, pur avendo rilevato micrometastasi linfonodali, la sede del linfonodo non ha influito sulla ristadiazione.

L'analisi molecolare ha confermato invece tutte le diagnosi per i pazienti N2.

7.9 Ottimizzazione dell'analisi molecolare

Confermata la metodica di Real-Time RT PCR per la ricerca di micrometastasi linfonodali nella casistica NSCLC, è stata presa la decisione di apportare delle modifiche alle miscele di reazione per determinare un aumento di specificità, diminuire i tempi di analisi e i costi.

Queste nuove caratteristiche sono state rese possibili dall'adozione di una miscela in grado di effettuare una RetroAmplificazione dell'RNA/cDNA "One Step". Questo ha permesso di:

- 1) eliminare i passaggi necessari per effettuare le reazioni separate di retrotrascrizione dell'RNA e amplificazione del cDNA. In questo modo è stato possibile ridurre i tempi di lavoro manuale e di eliminare le eventuali cross-contaminazioni causate dall'operatore maneggiando il cDNA (altamente contaminante).
- 2) Abbattere i tempi di reazione. La metodica classica necessitava di 5 ore complessive tra retrotrascrizione e amplificazione; la metodica One-Step necessita di solamente 90 minuti.
- 3) Diminuire i volumi di reazione (25 µl contro 50 µl) e di conseguenza i costi

Ulteriore aumento di specificità è stato reso possibile dal disegno di una nuova coppia di primers, posizionata a cavallo di esoni diversi per evitare l'amplificazione di DNA genomico, e dall'utilizzo di una sonda TaqMan MGB, che grazie alle sue proprietà chimico-fisiche ha permesso di aumentare la specificità del test.

La funzionalità della nuova miscela di reazione è stata testata valutando una parte della casistica, precedentemente analizzata, mostrando una completa concordanza con lo studio iniziale.

Anche l'analisi quantitativa del numero di cellule, risultate positive per il CEA mRNA, ha permesso di confermare la bontà del nuovo saggio, senza rilevare differenze statisticamente significative con la metodica precedente ($P > 0.4$).

7.10 Valutazione Q3 Real-Time PCR

La collaborazione tra Clonit srl e ST Microelectronics ha permesso lo sviluppo di un nuovo prototipo per Real-Time PCR.

Lo studio intrapreso per valutarne l'autentica capacità diagnostica ha mostrato una completa concordanza con i saggi effettuati sugli strumenti Applied Biosystems.

L'analisi quantitativa, per il numero di cellule CEA mRNA positive, non ha mostrato differenze statisticamente significative con i dati ottenuti mediante le altre due piattaforme Real-Time PCR ($P > 0.1$). Bisogna in ogni caso evidenziare una certa variabilità dei dati ottenuti, che pur restando nell'errore attribuibile allo strumento, sarà oggetto di indagini future per apportare le adeguate modifiche al nuovo sistema di analisi.

Complessivamente, grazie all'utilizzo di questa piattaforma, è stato possibile ridurre ulteriormente i volumi di reazione (e di conseguenza i costi) da 25 μ l a 10 μ l di volume finale, senza apportare alcuna variazione alla quantità di RNA analizzato rispetto al primo studio. Questo è stato reso possibile dall'utilizzo della miscela di RetroAmplificazione One-Step: eliminando il prelievo di cDNA, dalla provetta di retrotrascrizione, per dispensarlo nella miscela di amplificazione si evita una diluizione del materiale oggetto di indagine, permettendo di mantenere le stesse concentrazioni finali pur partendo da un volume iniziale inferiore.

8. CONCLUSIONI

I risultati conseguiti con il presente studio hanno permesso di constatare che la biologia molecolare si può porre come un ottimo supporto per le analisi convenzionali pre e post-operatorie, portando ad una diagnosi più accurata che si potrebbe spiegare in un aumento della sopravvivenza libera da malattia.

Possiamo infatti affermare, che la valutazione mediante Real-Time RT-PCR, del messaggero del CEA, può essere uno strumento maggiormente sensibile e specifico nell'identificazione delle micrometastasi rispetto all'analisi istologica. In merito anche agli ultimi sviluppi di questo studio possiamo affermare di aver ottenuto una metodica, che oltre alle caratteristiche sopracitate, presenta

- 1) una tempistica di analisi ottimale;
- 2) un aumento dell'automatizzazione, rendendo di facile esecuzione le analisi;
- 3) un abbattimento dei costi.

Grazie a queste peculiarità, la ricerca di micrometastasi linfonodali mediante Real-Time RT-PCR si presenta come un saggio veloce, di facile utilizzo e con un costo relativamente accessibile.

Sotto questa luce, l'utilizzo di questa metodica potrebbe essere estesa in diverse cliniche, portando a un miglioramento in campo diagnostico oncologico in quanto, la combinazione delle informazioni cliniche e molecolari potrebbero migliorare le previsioni sul rischio di recidiva e sulla probabilità di una prognosi positiva. Infatti, combinando i risultati ottenuti mediante analisi molecolare con la diagnosi convenzionale, si otterrebbe una stadiazione più esatta, consentendo di personalizzare e migliorare la qualità delle cure ed il loro esito negli stadi già avanzati, migliorando complessivamente le aspettative di vita dei pazienti.

9. BIBLIOGRAFIA

- 1) Joint Committee on Cancer Staging Manual” (AJCC), 1997).
- 2) Tanaka M, Kitajima Y, Sato S, Miyazaki K. Combined evaluation of mucin antigen and E-cadherin expression may help select patients with gastric cancer suitable for minimally invasive therapy. *Br J Surgery* 2003; 90 (1): 95-101.
- 3) Olga V. Bajenova, Regis Zimmer, Eugenia Stolper, John Salisbury-Rowswell, Afshan Nanji, and Peter Thomas. Heterogeneous RNA-binding Protein M4 Is a Receptor for Carcinoembryonic Antigen in Kupffer Cells. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 276, No. 33, Issue of August 17, pp. 31067–31073, 2001.
- 4) Pignatelli M, Durbin H, Bodmer WF. Carcinoembryonic antigen functions as an accessory adhesion molecule mediating colon epithelial cell–collagen interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1541–5.
- 5) Yoshioka T, Masuko T, Kotanagi H, *et al.* Homotypic adhesion through carcinoembryonic antigen plays a role in hepatic metastasis development. *Jpn J Cancer Res* 1998;89: 177–85.
- 6) Riken Kawachi*, Yohko Nakazato, Hidefumi Takei, Yoshihiko Koshi-ishi, Tomoyuki Goya. Clinical significance of preoperative carcinoembryonic antigen level for clinical stage I non-small cell lung cancer: can preoperative carcinoembryonic antigen level predict pathological stage? *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery* 9 (2009) 199–202.
- 7) Ahmedin Jemal, DVM, PhD; Freddie Bray, PhD; Melissa M. Center, MPH; Jacques Ferlay, ME; Elizabeth Ward, PhD; David Forman, PhD. Global Cancer Statistics. *CA CANCER J CLIN* 2011;61:69–90.
- 8) Sant M, Aareleid T, Berrino F, Bielska Lasota M, Carli P, Faivre J, Grosclaude P, Hédelin G, Matsuda T, Moller H, Moller T, Verdecchia A, Capocaccia R, Gatta G, Micheli A, Santaquilani M, Roazzi P, Lisi D,

EUROCARE Working Group. Eurocare-3: survival of cancer patients diagnosed 1990-94-results and commentary. *Annals of oncology*2003;14(Suppl.5):v61-v118.

9) The EUROCARE-3 database: methodology of data collection, standardisation, quality control and statistical analysis. Capocaccia R, Gatta G, Roazzi P, Carrani E, Santaquilani M, De Angelis R, Tavilla A; EUROCARE Working Group. *Ann Oncol.* 2003;14 Suppl 5:v14-27.

10) Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.* 55, 74–108 (2005).

11) Khuder, S. A. Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer* 31, 139–148 (2001).

12) Kreuzer, M., Kreienbrock, L., Muller, K. M., Gerken, M. & Wichmann, E. Histologic types of lung carcinoma and age at onset. *Cancer* 85, 1958–1965 (1999).

13) Toh, C. K. *et al.* Never-smokers with lung cancer: epidemiologic evidence of a distinct disease entity. *J. Clin. Oncol.* 24, 2245–2251 (2006).

14) Dibble, R., Langeburg, W., Bair, S., Ward, J. & Akerley, W. Natural history of non-small cell lung cancer in non-smokers. 23, 7252 (2005).

15) Lee, C.T. *et al.* Characteristics of lung cancer in Korea, 1997. *Lung Cancer* 30, 15–22 (2000).

16) Rachtan, J. Smoking, passive smoking and lung cancer cell types among women in Poland. *Lung Cancer* 35, 129–136 (2002).

17) Brownson, R. C., Alavanja, M. C., Caporaso, N., Simoes, E. J. & Chang, J. C. Epidemiology and prevention of lung cancer in nonsmokers. *Epidemiol. Rev.* 20, 218–236 (1998).

- 18) Boffetta, P. *et al.* Multicenter case-control study of exposure to environmental tobacco smoke and lungcancer in Europe. *J. Natl Cancer Inst.* 90, 1440–1450 (1998).
- 19) Du, Y. X. *et al.* An epidemiological study of risk factors for lung cancer in Guangzhou, China. *Lung Cancer* 14 (Suppl. 1), S9–S37 (1996).
- 20) Prasad, R. *et al.* Clinicopathological study of bronchogenic carcinoma. *Respirology* 9, 557–560 (2004).
- 21) Radzikowska, E., Glaz, P. & Roszkowski, K. Lung cancer in women: age, smoking, histology, performance status, stage, initial treatment and survival. Population-based study of 20 561 cases. *Ann. Oncol.* 13, 1087–1093 (2002).
- 22) Kabat, G. C. & Wynder, E. L. Lung cancer in nonsmokers. *Cancer* 53, 1214–1221 (1984).
- 23) Muscat, J. E. & Wynder, E. L. Lung cancer pathology in smokers, ex-smokers and never smokers. *Cancer Lett.* 88, 1–5 (1995).
- 24) Stockwell, H. G. *et al.* Environmental tobacco smoke and lung cancer risk in nonsmoking women. *J. Natl Cancer Inst.* 84, 1417–1422 (1992).
- 25) Gursel, G., Levent, E., Ozturk, C. & Karalezli, A. Hospital based survey of lung cancer in Turkey, a developing country, where smoking is highly prevalent. *Lung Cancer* 21, 127–132 (1998).
- 26) Ko, Y. C. *et al.* Risk factors for primary lung cancer among non-smoking women in Taiwan. *Int. J. Epidemiol.* 26, 24–31 (1997).
- 27) Yu, I. T., Chiu, Y. L., Au, J. S., Wong, T. W. & Tang, J. L. Dose-response relationship between cooking fumes exposures and lung cancer among Chinese nonsmoking women. *Cancer Res.* 66, 4961–4967 (2006).

- 28) Zhong, L., Goldberg, M. S., Gao, Y. T. & Jin, F. A case-control study of lung cancer and environmental tobacco smoke among nonsmoking women living in Shanghai, China. *Cancer Causes Control* 10, 607–616 (1999).
- 29) Liu, N. S. *et al.* Adenocarcinoma of the lung in young patients: the M. D. Anderson experience. *Cancer* 88, 1837–1841 (2000).
- 30) Jemal, A., Chu, K. C. & Tarone, R. E. Recent trends in lung cancer mortality in the United States. *J. Natl Cancer Inst.* 93, 277–283 (2001).
- 31) Jemal, A., Ward, E. & Thun, M. J. Contemporary lung cancer trends among U. S. women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14, 582–585 (2005).
- 32) Merrick DT, Haney J, Petrunich S, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor and its receptors in bronchial dysplasia demonstrated by quantitative RT-PCR analysis. *Lung Cancer* 2005; 48:31-45.
- 33) Sun S, Schiller J, Gazdar A. Lung cancer in never smokers - a different disease. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(10): 778 790.
- 34) Subramanian, J. & Govindan, R. Lung cancer in never smokers: a review. *J. Clin. Oncol.* 25, 561–570 (2007).
- 35) Boffetta, P. Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. *Mutat. Res.* 608, 157–162 (2006).
- 36) Alberg, A. J., Brock, M. V. & Samet, J. M. Epidemiology of lung cancer: looking to the future. *J. Clin. Oncol.* 23, 3175–3185 (2005)
- 37) Mollerup, S., Jorgensen, K., Berge, G. & Haugen, A. Expression of estrogen receptors alpha and beta in human lung tissue and cell lines. *Lung Cancer* 37, 153–159 (2002).

- 38) Kawai, H. *et al.* Estrogen receptor α and β are prognostic factors in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 5084–5089 (2005).
- 39) Schwartz, A. G. *et al.* Nuclear estrogen receptor beta in lung cancer: expression and survival differences by sex. *Clin. Cancer Res.* 11, 7280–7287 (2005).
- 40) Siegfried, J. M. Women and lung cancer: does oestrogen play a role? *Lancet Oncol* 2, 506–513 (2001).
- 41) Cote, M. L., Kardia, S. L., Wenzlaff, A. S., Ruckdeschel, J. C. & Schwartz, A. G. Risk of lung cancer among white and black relatives of individuals with earlyonset. Lung cancer. *JAMA* 293, 3036–3042 (2005).
- 42) Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J. & Haber, D. A. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature Rev. Cancer* 7, 169–181 (2007). Comprehensive review of a timely and important subject.
- 43) Shepherd, F. A. *et al.* Erlotinib in previously treated non small cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 353, 123–32 (2005). First randomized clinical trial demonstrating survival benefit with EGFR TKI inhibitor therapy in previously treated NSCLC.
- 44) Thatcher, N. *et al.* Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non small cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet* 366, 1527–1537 (2005).
- 45) Herbst, R. S. *et al.* TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non small cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 23, 5892–5899 (2005).

- 46) Lynch, T. J. *et al.* Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non small cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 350, 2129–2139 (2004). First identification (along with reference 116) of mutations in the *EGFR* gene associated with clinical response to EGFR TKI inhibitors.
- 47) Paez, J. G. *et al.* EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304, 1497–1500 (2004).
- 48) Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J. & Haber, D. A. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature Rev. Cancer* 7, 169–181 (2007). Comprehensive review of a timely and important subject.
- 49) Shigematsu, H. & Gazdar, A. F. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int. J. Cancer* 118, 257–262 (2006).
- 50) Downward, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Rev. Cancer* 3, 11–22 (2003).
- 51) Vahakangas, K. H. *et al.* p53 and K ras mutations in lung cancers from former and never-smoking women. *Cancer Res.* 61, 4350–4356 (2001).
- 52) Le Calvez, F. *et al.* *TP53* and *KRAS* mutation load and types in lung cancers in relation to tobacco smoke: distinct patterns in never, former, and current smokers. *Cancer Res.* 65, 5076–5083 (2005). Modest sized but well conducted study on the relationship of *TP53* mutation pattern, smoking and lung cancer.
- 53) Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, et al. Relation of neovascularization to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 1992; 340: 1120-1124.

- 54) Yuan A, Yang PC, Yu CJ, et al. Tumor angiogenesis correlates with histologic type and metastasis in non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 2157-2162.
- 55) Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, et al. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265: 1582-1584.
- 56) Yuan A, Yu CJ, Luh KT, Kuo SH, Lee YC, Yang PC. Aberrant p53 expression of vascular endothelial growth factor mRNA and interleukin-8 mRNA and neoangiogenesis in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20 (4): 900-910.
- 57) Cheng YL, Lee SC, Harn Hj, et al. Prognostic prediction of immunohistochemical expression of p53 and p16 in resected non-small cell lung cancer. *Eur J Card Thorac Surgery* 2003; 23: 221-228.
- 58) World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Di William D. Travis, 2004
- 59) Subramanian J, Morgensztern D, Goofgame B, et al. Distinctive characteristics of non-small cell lung cancer (NSCLC) in the young: A surveillance, epidemiology, and end results (SEER) analysis. *J Thorac Oncol*. 2010; 5:23-28.
- 60) Breathnach OS; Ishibe N, Williams J, Linnoila RI, Caposaso N, Johnson BE. Clinical features of patients with stage IIIB and IV bronchioalveolar carcinoma of the lung. *Cancer* 1999; 86; 1165-1173
- 61) Breathnach OS, Kwiatkowski DJ, Godleski JJ, Finkelstein D, Sugarbaker DJ, Johnson BE, et al. Bronchioloalveolar carcinoma of the lung: recurrences and survival in patients with stage I disease. *Proc ASCO* 2000; 19:502.

62) Elisabeth Brambilla, MD, PhD. The Histologic Reclassification of Adenocarcinoma of the Lung: Implication for Diagnosis and Therapy. 2011 American Society of Clinical Oncology.

63) This official statement of the American thoracic society and the European respiratory society was adopted by the ats board of directors, march 1997 and by the ers executive committee, april 1997 and endorsed by the American college of chest. Physicians board of regents. Pretreatment Evaluation of Non–Small-cell Lung Cancer. American journal of respiratory and critical care medicine VOL. 156 1997.

64) Yarbro JW. Introductory remarks to the Conference on Prognostic Factors and Staging in Cancer Management: contributions of artificial neural networks and other statistical methods. Cancer 2001;91(Suppl8):1593-4.

65) Perng RP, Chen CY, Chang GC, Hsia TC, Hsu NY, Tsai YH, et al. Revisit of 1997 TNM staging system–survival analysis of 1112 lung cancer patients in Taiwan. Jpn J Clin Oncol 2007;37:9-15.

66) Choi YJ, Yun HR, Yoo KE, Kim JH, Nam SJ, Choi YL, et al. Intraoperative examination of sentinel lymph nodes by ultrarapid immunohistochemistry in breast cancer. Jpn J Clin Oncol 2006;36:489-93.

67) Nagatani S, Shimada Y, Li Z, Kaganoi J, Kan T, Maeda M, et al. Validation of intra-operative detection of paratracheal lymph node metastasis using real-time RT-PCR targeting esophageal squamous cell carcinoma. Jpn J Clin Oncol 2003;33:549-55.

68) Fukai R, Sakao Y, Sakuraba M, Oh S, Shiomi K, Sonobe S, et al. The prognostic value of carcinoembryonic antigen in T1N1M0 and T2N1M0 non-small cell carcinoma of the lung. Eur J Cardiothorac Surg 2007;32:440-444.

- 69) Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD. Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax* 2003;58:892-900.
- 70) the value of lung cancer detection by six-monthly chest radiographs. G. Z. Brett. *Thorax* 1968;23:414-420 doi:10.1136/thx.23.4.414.
- 71) Impact of early detection on the clinical course of lung cancer. Melamed MR, Flehinger BJ, Zaman MB *Surg Clin North Am.* 1987 Oct;67(5):909-24.
- 72) Lack of benefit from semi-annual screening for cancer of the lung: Follow-up report of a randomized controlled trial on a population of high-risk males in czechoslovakia. Kubik¹, D. M. Parkin², M. Khatib², J. Erban¹, J. Polak, M. Adamec. Volume 45, Issue 1, pages 26-33, 15 January 1990
- 73) Lung Cancer Mortality in the Mayo Lung Project: Impact of Extended Follow-up. Pamela M. Marcus, Erik J. Bergstralh, Richard M. Fagerstrom, David E. Williams, Robert Fontana, William F. Taylor and Philip C. Prorok.
- 74) Rate of Lung Cancer on the Chest Radiograph in Clinical Practice: Lorentz G.B.A. Quekel, MD, Alphons G.H. Kessels, MD, Reginald Goei, MD and Joseph M.A. van Engelshoven, MD. *CHEST* March 1999 vol. 115 no. 3 720-724.
- 75) Prognostic Value of Thoracic FDG PET Imaging After Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer. Edward F. Patz Jr., John Connolly and James Herndon. *AJR* March 2000 vol. 174 no. 3 769-774.
- 76) Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y, Brambilla E. Histological typing of lung and pleural tumors, World Health Organization International Histological Classification of Tumors. Berlin: Springer; 1999.
- 77) Piters KM, Evans WK, Azzoli CG et al. Cancer Care Ontario and American Society of Clinical Oncology adjuvant chemotherapy and radiation

therapy for stage I-IIIa resectable non-small-cell lung cancer guideline. *J. Clin. Oncol.* 2007 ; 25 : 5506-5518.

78) Roy S. Herbst, M.D., Ph.D., John V. Heymach, M.D., Ph.D., and Scott M. Lippman, M.D. Molecular origins of Cancer: Lung Cancer. *N.Engl.J.Med.* 359;13 September 25, 2008.

79) Beane J. Sebastian P, Whitfield TH, et al. A prediction model for lung cancer diagnosis that integrates genomic and clinical features. *Cancer Prev. Res.* 2008;1:56-64.

80) Shedden K, Taylor JM, Enkemann SA, et al. Gene expression-based survival prediction in lung cancer diagnosis that integrates genomic and clinical features. *Cancer Prev Res* 2008;14:822-7.

81) Walter J. Scott, John Howington, Steven Feigenberg, Benjamin Movsas and Katherine Pisters. Treatment of Non-small Cell Lung Cancer Stage I and Stage II * : ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (2nd Edition). *Chest* 2007;132;234S-242S.

82) Dowlatshahi K, Fan M, Snider HC, Habib FA. Lymph node micrometastases for breast carcinoma: reviewing the dilemma. *Cancer* 1997; 80: 1188-1197.

83) Melfi FM, Lucchi M, Davini F, Viti A, Fontanini G, Boldrini L, et al. Intraoperative sentinel lymph node mapping in stage I non-small cell lung cancer: detection of micrometastases by polymerase chain reaction. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008;34:181–6.

84) Pulte D, Li E, Crawford BK, Newman E, Alexander A, Mustalish DC, et al. Sentinel lymph node mapping and molecular staging in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2005;104:1453–61.

- 85) Inoue M, Minami M, Shiono H, Sawabata N, Ideguchi K, Okumura M. Clinicopathologic study of resected, peripheral, small-sized, non-small cell lung cancer tumors of 2 cm or less in diameter: pleural invasion and increase of serum carcinoembryonic antigen level as predictors of nodal involvement. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;131:988–993.
- 86) Matsuoka K, Sumitomo S, Nakashima N, Nakajima D, Misaki N. Prognostic value of carcinoembryonic antigen and CYFRA21-1 in patients with pathological stage I non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007;32:435–439.
- 87) Matsuguma H, Nakahara R, Igarashi S, Ishikawa Y, Suzuki H, Miyazawa N, Honjo S, Yokoi K. Pathologic stage I non-small cell lung cancer with high levels of preoperative serum carcinoembryonic antigen: clinicopathologic characteristics and prognosis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;135:44–49.
- 88) Hammarström S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol*, 1999, 9(2): 67-81.
- 89) Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of human digestive system. *J Exp Med* 1965;122: 467-81.
- 90) von Kleist S, Burtin P. Localisation cellulaire d'un antigène embryonnaire de tumeurs coliques humaines. *Int J Cancer* 1969;4:874–9.
- 91) Zimmermann W, Weber B, Ortlieb B, Rudert F, Schempp W, Fiebig HH, Shively JE, von Kleist S, Thompson J 1988. Chromosomal localization of the carcinoembryonic antigen gene family and differential expression in various tumors. *Cancer Res* 48:2550-2554.
- 92) Thompson J, Zimmermann W, Osthus-Bugat P, Schleussner C, Eades-Perner AM, Barnert S, von Kleist S, Willcocks T, Craig I, Tynan K, Olsen A,

Mohrenweiser H _1992.. Longrange chromosomal mapping of the carcinoembryonic anti-gen _CEA. gene family cluster. *Genomics* 12:761]772.

93) Brandriff BF, Gordon LA, Tynan KT, Olsen AS, Mohrenweiser HW, Fertitta A, Carrano AV, Trask BJ _1992. Order and genomic distances among members of the carcinoembryonic antigen _CEA. gene family determined by fluorescence *in situ* hybridization. *Genomics* 12:773]779.

94) *Sten Hammarstro..m.* The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *seminars in CANCER BIOLOGY*, Vol 9, 1999: pp. 67]81.

95) Olsen A, Teglund S, Nelson D, *et al.* Gene organization of the pregnancy specific glycoprotein region on human chromosome 19: Assembly and analysis of a 700 kb cosmid contig spanning the region. *Genomics*, 1994, 23(3): 659-668.

96) Prall F, Nollau P, Neumaier M, *et al.* CD66a (BGP) an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J Histochem Cytochem*, 1996, 44(1): 35-41.

97) Stocks SC, Albrechtsen M, Kerr MA. Expression of the CD15 differentiation antigen (3-fucosyl-Nacetyllactosamine, Lex) on putative neutrophil adhesion molecules CR3 and NCA-160. *Biochem J* 1990;268:275–80.

98) Kuijpers TW, Hoogerwerf M, van der Laan LJ. CD66 nonspecific cross reacting antigens are involved in neutrophil adherence to cytokine-activated endothelial cells. *J Cell Biol* 1992;118:457–66.

- 99) Benchimol S, Fuks A, Jothy S, Beauchemin N, Shirota K, Stanners CP _1989. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* 57:327]334.
- 100) Oikawa S, Kuroki M, Matsuoka Y, Kosaki G, Nakazato H 1992. Homotypic and heterotypic Ca²⁺-independent cell adhesion activities of biliary glycoprotein, a member of carcinoembryonic antigen family, expressed on CHO cell surface. *Biochem Biophys Res Commun* 186:881]887.
- 101) Zhou H, Stanners CP, Fuks A _1993. Specificity of anticarcinoembryonic antigen monoclonal antibodies and their effects on CEA-mediated adhesion. *Cancer Res* 53: 3817]3822.
- 102) Thomson DMP, Krupey J, Freedman SO, Gold P _1966. The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive tract. *Proc Natl Acad Sci USA* 64: 161]167.
- 103) Ursavaş A, Karadağ M, Ercan İ, *et al.* Serum carcinoembryonic antigen level as a predictive marker for distant metastasis in non-small cell lung cancer. *Euro J Gene Med*, 2007, 4(3): 107-114.
- 104) Stevens DP, Mackay IR. Increased carcinoembryonic antigen in heavy cigarette smokers. *Lancet* 1973;2:1238–1239.
- 105) Kinugasa T, Kuroki M, Yamanaka T, *et al.* Non-proteolytic release of carcinoembryonic antigen from normal human colonic epithelial cells cultured in collagen gel. *Int J Cancer*, 1994, 58(1): 102-107.
- 106) Thompson J, Seitz M, Chastre E, *et al.* Down-regulation of carcinoembryonic antigen family member 2 expression is an early event in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*, 1997, 57(9): 1776-1784.

- 107) Ohwada A, Takahashi H, Nagaoka I, *et al.* Biliary glycoprotein mRNA expression is increased in primary lung cancer, especially in squamous cell carcinoma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1994, 11(2): 214-220.
- 108) Concannon JP, Dalbow MH, Hodgson SE, *et al.* Prognostic value of preoperative carcinoembryonic antigen (CEA) plasma levels in patients with bronchogenic carcinoma. *Cancer* 1978;42:1477–83.
- 109) Ford CH, Stokes HJ, Newman CE. Carcinoembryonic antigen and prognosis after radical surgery for lung cancer: immunocytochemical localization and serum levels. *Br J Cancer* 1981;44:145–53.
- 110) Dent PB, McCulloch PB, Wesley-James O, MacLaren R, Muirhead W, Dunnett CW. Measurement of carcinoembryonic antigen in patients with bronchogenic carcinoma. *Cancer* 1978;42:1484–91.
- 111) Sawabata N, Ohta M, Takeda S, *et al.* Serum carcinoembryonic antigen level in surgically resected clinical stage I patients with non–small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2003;74:174–9.
- 112) Okada M, Sakamoto T, Nishio W, Uchino K, Tsubota N. Characteristics and prognosis of patients after resection of nonsmall cell lung carcinoma measuring 2 cm or less in greatest dimension. *Cancer* 2003;98:535–41.
- 113) Okada M, Nishio W, Sakamoto T, *et al.* Prognostic significance of perioperative serum carcinoembryonic antigen in non–small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*. In press
- 114) Suzuki K, Nagai K, Yoshida J, *et al.* Prognostic factor in clinical stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*, 1999, 67(4): 927-932.
- 115) Cristofori B, Amio G, Mengozzi G, *et al.* Tumor markers kinetic malignant lung neoplasm. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 1999, 40(2):299-305.

116) Nouwen J, Rollet E, Eerdekens W, *et al.* Immunohistochemical localization of placental alkaline phosphatase, carcinoembryonic antigen, and cancer antigen 125 in normal and neoplastic human lung. *Cancer Res*, 1986, 46(2): 866-876.

117) Morihito Okada, MD, PhD, Wataru Nishio, MD, PhD, Toshihiko Sakamoto, MD, PhD, Kazuya Uchino, MD, Tsuyoshi Yuki, MD, Akio Nakagawa, MD, and Noriaki Tsubota, MD, PhD. Effect of Histologic Type and Smoking Status on Interpretation of Serum Carcinoembryonic Antigen Value in Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Ann Thorac Surg* 2004;78:1004–10.

118) Pfannschmidt J, Muley T, Buzibruck H, Hoffmann H, Dienemann H, *et al.* Prognostic assessment after surgical resection for non-small cell lung cancer: experiences in 2083 patients. *Lung Cancer* 2007;55:371-7.

119) Jun Maeda, Masayoshi Inoue, Meinoshin Okumura, Mitsunori Ohta, Masato Minami, Hiroyuki Shiono, Yasushi Shintani, Hikaru Matsuda, Nariaki Matsuura. Detection of occult tumor cells in lymph nodes from non-small cell lung cancer patients using reverse transcription-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen mRNA with the evaluation of its sensitivity. *Lung Cancer* (2006) 52, 235—240.

120) Yuan Qiu†, Haihong Yang†, Hanzhang Chen, Linhu Ge, Xin Xu, Xinguo Xiong and Jianxing He. Detection of CEA mRNA, p53 and AE1/AE3 in Haematoxylin–eosin-negative Lymph Nodes of Early-stage Non-small Cell Lung Cancer May Improve Veracity of N Staging and Indicate Prognosis. *Jpn J Clin Oncol* 2010;40(2)146–152.

121) Nasar Yousuf ALWAHAIBI1, Jokha Sultan ALGHARIBI1, Amna Salim ALSHUKAILI1, Ahmed Khalifa ALSHUKAILI2. Tissue Carcinoembryonic Antigen, Calcium, Copper and Iron Levels in Cancerous Lung Patients. *Chin J Lung Cancer*, Januar • 28 • y 2011, Vol.14, No.1.

- 122) Hostetter RI, Augustus LB, Mankarious R, *et al.* Carcinoembryonic antigen as a selective enhancer of colorectal cancer metastases. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82(5): 380-385.
- 123) International Union Against Cancer. Lung tumours. In: Sobin LH, Wittekind CH, editors. TNM classification of malignant tumours. 6th edition. New York: Wiley-Liss; 2002.
- 124) Rami-Porta R, Crowley JJ, Goldstraw P. The revised TNM staging system for lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2009;15:4–9.
- 125) D’Cunha J, Corfits AL, Herndon JE, Kern JA *et al.* Molecular staging of lung cancer: real-time polymerase chain reaction estimation of lymph node micrometastatic tumor cell burden in stage I non-small cell lung cancer. Preliminary results of cancer and Leukemia Group B Trial 9761. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123 (3): 484-491.
- 126) Quantitative real-time polymerase chain reaction detection of lymph node lung cancer micrometastasis using carcinoembryonic antigen marker. Nosotti M, Falleni M, Palleschi A, Pellegrini C, Alessi F, Bosari S Santambrogio L. *Chest*. 2005 Sep;128(3):1539-44.
- 127) Jun Maeda, Masayoshi Inoue, Kazuki Nakabayashi, Yasuhiro Otomo, Yasushi Shintani, Mitsunori Ohta, Meinoshin Okumura, Nariaki Matsuura. Rapid diagnosis of lymph node metastasis in lung cancer with loop-mediated isothermal amplification assay using carcinoembryonic antigen–mRNA. *Lung Cancer* 65 (2009) 324–327.
- 128) Effect of cigarette smoke on the mRNA and protein expression of carcinoembryonic antigen (CEA), a possible chemoattractant for neutrophils in human bronchioloalveolar tissues Akihiko Ohwada, Hideki Takahashi, Isao Nagaoka, Kazuhisa Iwabuchi, Osamu Mikami, Shiro Kira. *Thorax* 1995;50:651-657.

129) Kutuyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB, Hedgeth J. 3'- minor groove binder –DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* 2000;28:655-61.

130) Rosemberg R, Hoos A, Muller J, Nekarda H. Impact of cytokeratin-20 and carcinoembryonic antigen mRNA detection by RT-PCR in regional lymph nodes of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000; 83 (10): 1323-1329.