



*UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELL'INSUBRIA*

*DOTTORATO DI RICERCA IN  
MEDICINA SPERIMENTALE E ONCOLOGIA  
XXV ciclo*

*Coordinatore: Chiar.mo Prof. Antonio Toniolo*

***ESPRESSIONE DEL FIBRINOGENO***

***NEL CARCINOMA ENDOMETRIALE:***

***ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA E MOLECOLARE***

*Tutor: Prof. Fabio Ghezzi*

*Tesi di Dottorato di:  
Stefano Uccella  
Matr. n. 255606*

*Anno Accademico 2011-2012*

A Renato

*“May your strength give us strength  
May your faith give us faith  
May your hope give us hope  
May your love give us love”*

B. S.

A Francesca

*Scenderò, “dandoti il braccio,  
almeno un milione di scale”*

E. M.

Ad Alessandro

*“Sentir – riprese – e meditar.  
Di poco esser contento.  
Dalla meta mai non volger gli occhi.  
Conservar lo sguardo puro e la mente.  
Il Santo Vero mai non tradir”*

A. M.

## **INDICE**

<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>4</b>
<b>FATTORI DI RISCHIO DEL CARCINOMA ENDOMETRIALE.....</b>	<b>6</b>
<b>CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE E MOLECOLARI .....</b>	<b>8</b>
<b>VIE DI DIFFUSIONE.....</b>	<b>11</b>
<b>PRESENTAZIONE CLINICA, DIAGNOSI ED ACCERTAMENTI STRUMENTALI .....</b>	<b>14</b>
<b>STADIAZIONE.....</b>	<b>16</b>
<b>TERAPIA.....</b>	<b>19</b>
<b>BIOMARCATORI NEL CARCINOMA ENDOMETRIALE.....</b>	<b>24</b>
<b>FIBRINOGENO E TUMORI MALIGNI EPITELIALI .....</b>	<b>29</b>
<b>IL FIBRINOGENO NEL CARCINOMA ENDOMETRIALE: RISULTATI DEGLI STUDI CLINICI.....</b>	<b>32</b>
<b>SCOPO DELLO STUDIO .....</b>	<b>34</b>
<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>35</b>
<b>RISULTATI.....</b>	<b>41</b>
<b>DISCUSSIONE.....</b>	<b>51</b>
<b>CONCLUSIONI .....</b>	<b>56</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>57</b>
<b>RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>68</b>

## **INTRODUZIONE**

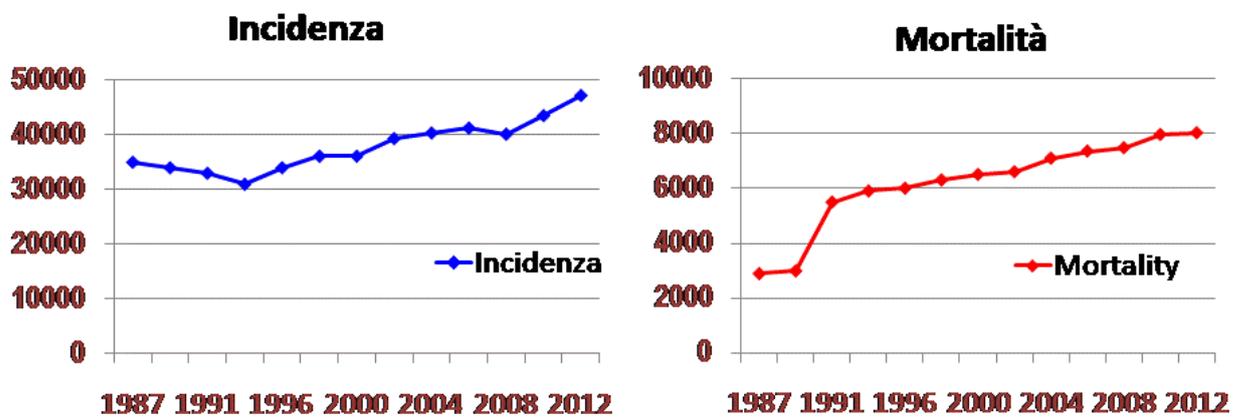
Il Carcinoma del corpo uterino, più propriamente detto carcinoma endometriale, rappresenta globalmente il sesto tumore in ordine di frequenza nella donna ed è stato stimato che nel solo anno 2008 un totale di 287.100 donne si siano ammalate di tale neoplasia nel mondo [1].

L'incidenza però nei Paesi Occidentali è addirittura maggiore: i dati delle *Cancer Statistics* che ogni anno vengono pubblicate su *CA – A Cancer Journal for Clinicians* riguardo gli Stati Uniti d'America (USA) testimoniano che il carcinoma dell'endometrio è il tumore maligno più frequente del tratto genitale femminile, ed il quarto in ordine di incidenza nella donna. Si prevede che nell'anno solare 2013 si verificheranno 49.560 nuovi casi e 8.190 decessi negli Stati Uniti d'America [2]. Uno degli aspetti più preoccupanti riguardo questo tumore (Figura 1) è che, nonostante l'incidenza sia rimasta relativamente stabile negli ultimi anni, la mortalità dovuta a carcinoma endometriale è più che raddoppiata rispetto ai 2.900 decessi calcolati per l'anno 1987 (dati sempre provenienti dalle statistiche statunitensi) [3].

E' verosimile che le cause dell'aumento di mortalità osservato negli ultimi decenni siano multifattoriali. Tuttavia appare necessario

una riconsiderazione critica dei procedimenti di prevenzione, screening, diagnosi, stadiazione e terapia che vengono messi in atto per questa patologia [4].

Figura 1. Incidenza e mortalità per carcinoma endometriale dal 1987 al 2012 (dati tratti da *Cancer Statistics. CA – A Cancer Journal for Clinicians* 1987 – 2012 [1,3]).



## **FATTORI DI RISCHIO DEL CARCINOMA ENDOMETRIALE**

Il 95% dei casi di carcinoma endometriale è considerato sporadico, mentre il 5% riconosce una eziologia ereditaria. La sindrome di Lynch, nota anche come HNPCC (Hereditary Non-Poliposis Colorectal Carcinoma) syndrome è la più frequente causa di tumore maligno dell'endometrio su base geneticamente trasmessa [5].

Per quanto riguarda le forme sporadiche, la letteratura si è occupata diffusamente dei fattori di rischio sia di natura epidemiologica che alimentare. La forma più comune di carcinoma endometriale (quella di tipo endometriode, detta anche tipo I) si associa fortemente alle caratteristiche principali della sindrome metabolica, ovvero obesità diabete ed ipertensione [6-11]. E' stato stimato che un body mass index  $\geq 30$  si correla con un aumento del rischio di tumore maligno dell'endometrio di circa 3 – 4 volte [6-7]. Anche la resistenza all'insulina e l'iperinsulinemia sembrano avere un ruolo importante nella carcinogenesi [11]. Altri fattori associati con lo sviluppo di carcinoma endometriale di tipo I sono tutte quelle condizioni associate ad iperestrogenismo assoluto o relativo (ad esempio l'anovulatorietà, la terapia estrogenica prolungata non adeguatamente affiancata da progestinico, la sindrome dell'ovaio policistico, la terapia con tamoxifene) [8-10].

E' interessante notare che recenti acquisizioni hanno evidenziato un ruolo protettivo di alcuni alimenti, ed in particolare del caffè: una meta-analisi pubblicata nel 2012 ha mostrato una riduzione di rischio del 29% tra le donne che bevono elevate quantità di questa bevanda rispetto a quelle che non ne bevono. In particolare, sembra che per ogni tazza di caffè in più assunta il rischio di carcinoma endometriale si riduca dell'8% [12]. Un recente studio ha puntualizzato che la riduzione del rischio si verifica per il tumore di tipo I ma non per quello di tipo II [13].

I fattori di rischio per il carcinoma endometriale di tipo II sono ancora relativamente poco esplorati e conosciuti. Recentemente è stato dimostrato come l'obesità costituisca un fattore di rischio anche per il tumore non endometriode [14]. E' molto interessante notare che l'assunzione di multivitaminici ed in particolar modo le supplementazioni con folati e vitamina B2, B6 e B12 si associno ad un aumento di rischio di carcinoma endometriale di tipo II [15].

## **CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE E MOLECOLARI**

Il carcinoma dell'endometrio costituisce un gruppo eterogeneo di neoplasie, tra le quali, come accennato, possono essere distinte due categorie principali, il tipo I e il tipo II, che differiscono per le caratteristiche istopatologiche, patogenetiche e cliniche.

Il carcinoma endometriale di tipo I si caratterizza per la sua istologia endometrioidale e rappresenta approssimativamente l'80-90% di tutti i casi di tumore dell'endometrio [16-17]. Il tipo II è costituito da carcinomi sieroso-papillari o a cellule chiare e rappresenta il restante 10-20% dei casi [16-17].

Dal punto di vista patogenetico, la suddivisione in tipo I e tipo II riflette anche differenze nelle anomalie molecolari che conducono a questi due diversi tipi di tumore endometriale. L'inattivazione del gene oncosoppressore *PTEN* è il difetto genetico più frequente nel tumore di tipo I, essendo presente in circa l'83% dei casi [18]: la perdita di *PTEN* risulta di solito un evento precoce nella carcinogenesi e sembra conferire un vantaggio proliferativo nel contesto di un ambiente ricco di estrogeni [19], mentre il progesterone induce l'involuzione delle cellule *PTEN*-mutate [20]. Un altro possibile evento precoce nella genesi del carcinoma dell'endometrio di tipo I è l'inattivazione del sistema di *mismatch repair*, che si verifica nel 15-20% dei tumori sporadici, ma

costituisce il principale fattore eziologico delle forme ereditarie [5,21-22]. Altri meccanismi molecolari che appaiono coinvolti nell'insorgenza del carcinoma endometriale di tipo I sono le mutazioni a carico di *KRAS*,  $\beta_1$ -*catenina*, e *CTNNB* [23-26].

Contrariamente a quanto detto per il tumore di tipo I, la mutazione di *p53* costituisce la più comune anomalia genetica nell'ambito del carcinoma dell'endometrio di tipo II [27]. Questo tipo di neoplasia si caratterizza per la frequente instabilità genetica e cromosomica [28]. Altre anomalie a livello molecolare che si associano con il tumore di tipo II includono l'inattivazione di *CDKN2A* e l'iperespressione di *ERBB* [29-30].

Le differenze morfologiche e molecolari tra i due gruppi di carcinoma dell'endometrio si riflettono anche in termini di comportamento clinico: quasi l'80% dei tumori di tipo I viene diagnosticato quando è ancora confinato all'utero [31], mentre questa percentuale si riduce al 50% e al 37%, rispettivamente quando si considerano i carcinomi a cellule chiare e sierosi [32-33]. In termini di sopravvivenza, quando si considerano tutti gli istotipi di carcinoma endometriale assieme, la percentuale di donne libere da malattia è dell'80% a 5 anni, mentre l'85% delle pazienti affette è viva dopo 5 anni dalla diagnosi. Quando si considera soltanto il carcinoma endometriale di tipo II, sia la sopravvivenza libera da

malattia, sia la sopravvivenza globale sono decisamente inferiori e scendono rispettivamente al 36-46% e al 45-55% [31-33].

## **VIE DI DIFFUSIONE**

Diagnosticare una malattia confinata all'utero rappresenta un fattore prognostico favorevole. Tuttavia, circa una donna ogni 3 tra coloro che muoiono per carcinoma endometriale era stata inizialmente considerata una paziente con patologia limitata all'utero [34]. Una grossa quota dei fallimenti del trattamento e conseguentemente della riduzione della sopravvivenza, potrebbe pertanto essere attribuibile alla incapacità di riscontrare una diffusione extra-uterina occulta al momento del trattamento primario.

Il carcinoma endometriale ha 4 vie di disseminazione che possono essere presenti singolarmente o in combinazione: (1) la diffusione per contiguità (principalmente alla vagina), (2) la via linfatica, (3) la via ematogena, e (4) la disseminazione intraperitoneale. In una popolazione non selezionata di 915 pazienti trattate per carcinoma endometriale durante un periodo di 13 anni presso la Mayo Clinic di Rochester, Minnesota (USA), il tasso di recidiva è stato rispettivamente del 5%, 9%, 6% e 6% per queste quattro diverse vie di diffusione [18].

### **Disseminazione vaginale**

Fattori predittivi di disseminazione vaginale sono il grado 3 istologico e l'invasione degli spazi linfovaskolari [35]. Sebbene la

maggior parte delle recidive vaginale possono essere trattate con successo in una elevata percentuale di casi [36], l'aggiunta della brachiterapia vaginale adiuvante al momento del trattamento iniziale riduce significativamente il rischio di tale evenienza [37].

### **Disseminazione linfatica**

La recidiva linfatica è più probabile quando sono presenti: invasione dello stroma cervicale e/o metastasi linfonodali alla prima chirurgia [18].

### **Disseminazione ematogena**

Una profonda infiltrazione del miometrio (>50% se si considerano tutti gli stadi, > 66% se si considera esclusivamente il I stadio) è il più importante fattore predittivo di recidiva per via ematogena [18].

### **Disseminazione peritoneale**

Fattori predittivi di recidiva peritoneale sono (a) lo stadio IV di malattia oppure (b) lo stadio II-III con almeno uno dei seguenti fattori: invasione dello stroma cervicale, citologia peritoneale positiva per cellule di carcinoma endometriale, coinvolgimento linfonodale, istologia non-endometrioide [18].

In Tabella I sono riassunti i fattori di rischio per recidiva ematogena, linfatica e peritoneale.

**Tabella 1.** Tassi di recidiva a 5 anni in base a diverse categorie di rischio  
Da Mariani A. et al. *Gynecol Oncol.* 2004;95:120-6 [18].

<b>Risk Category</b>	<b>Recurrence at 5 years</b>
<b>Hematogenous</b>	
<i>All stages</i>	
<i>Myometrial invasion ≤50%</i>	4%
<i>Myometrial invasion &gt;50%</i>	28%
<i>Stage I (negative lymph nodes)</i>	
<i>Myometrial invasion &lt;66%</i>	2%
<i>Myometrial invasion ≥66%</i>	34%
<b>Lymphatic</b>	
<i>No risk factors</i>	2%
<i>CSI and/or positive lymph nodes</i>	31%
<b>Peritoneal</b>	
<i>Stage IV disease</i>	63%
<i>Stage II-III disease and ≥2 risk factors<sup>a</sup></i>	21%
<i>Stage I-III disease and ≤1 risk factor<sup>a</sup></i>	1%
<b>Overall<sup>b</sup></b>	
<i>Not at risk<sup>c</sup></i>	2%
<i>At risk<sup>c</sup></i>	46%

Abbreviazioni: CSI, cervical stromal invasion.

<sup>a</sup>CSI, nonendometrioid histologic subtype, positive lymph nodes, positive result on peritoneal cytologic evaluation.

<sup>b</sup>Excluding vaginal recurrences.

<sup>c</sup>For at least 1 of the 3 categories of recurrence (ie, hematogenous, lymphatic, or peritoneal).

Le pazienti che rientrano in almeno una delle categorie di rischio elencate in Tabella 1, pur rappresentando solo il 35% delle donne affette da carcinoma endometriale, costituiscono l'89% di tutte le recidive ematogene, linfatiche e peritoneali osservate [18].

E' verosimile pensare che l'identificazione di sottogruppi di pazienti a maggiore rischio di ricorrenza possa permettere una terapia mirata verso le aree più probabili di recidiva e, auspicabilmente un miglioramento della prognosi.

## **PRESENTAZIONE CLINICA, DIAGNOSI ED**

### **ACCERTAMENTI STRUMENTALI**

Nonostante non esistano metodiche adeguate ed efficaci di screening, il carcinoma endometriale viene solitamente diagnosticato in stadio iniziale grazie all'insorgenza precoce dei suoi sintomi, in particolare il sanguinamento uterino anomalo. Quest'ultimo si verifica nel 90% dei casi e, soprattutto quando si presenta in post-menopausa, dovrebbe essere sempre considerato con sospetto [4]. Gli altri sintomi del carcinoma endometriale includono, dolore, senso di peso e distensione addominale, ma spesso insorgono più tardivamente.

Una volta sollevato il sospetto clinico di carcinoma endometriale, è possibile eseguire una ecografia transvaginale al fine di verificare lo spessore della rima endometriale (esistono diversi cut-off a seconda della fase del ciclo o dell'età pre-/post-menopausale) [4]. Alcuni autori hanno proposto anche l'utilizzo della risonanza magnetica. Tuttavia, l'esame di scelta per dirimere la diagnosi è senza dubbio la biopsia endometriale.

La Tomografia Assiale Computerizzata (TAC) addominale viene eseguita per accertare l'eventuale localizzazione extra-pelvica della malattia. La Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) al fine di verificare lo spessore di infiltrazione miometriale e lo stadio di

malattia è riservata alle pazienti giovani che volessero optare per un trattamento conservativo (*fertility-sparing*). Le indagini di imaging volte ad accertare la diffusione extra-addominale sono spesso (ma non sempre) limitate alla radiografia del torace.

## STADIAZIONE

L'attuale sistema di stadiazione del carcinoma endometriale (Tabella 2) è stato messo a punto dalla Federazione Internazionale di Ginecologia ed Ostetricia (FIGO) nel Maggio 2009 [38].

*Tabella 2. Sistema di Staging del carcinoma endometriale. Federazione Internazionale di Ginecologia ed Ostetricia 2009.*

<b>Stadio</b>	<b>Caratteristiche</b>
<u>Stadio I</u>	Il tumore è confinato al corpo dell'utero ma non alla sierosa
IA	Infiltrazione miometriale assente o comunque <50%
IB	Infiltrazione miometriale ≥ 50%
<u>Stadio II</u>	Il tumore invade lo stroma cervicale ma non si estende oltre l'utero (il solo coinvolgimento degli sfondati ghiandolari ma non dello stroma è considerato stadio I)
<u>Stadio III</u>	Il tumore coinvolge la sierosa dell'utero, gli annessi, la vagina o i linfonodi.
IIIA	Coinvolgimento della sierosa uterina o degli annessi.
IIIB	Coinvolgimento vaginale
IIIC	Coinvolgimento dei linfonodi retroperitoneali.
IIIC1	Linfonodi pelvici positivi
IIIC2	Linfonodi lomboaortici positive con o senza positività dei linfonodi pelvici
<u>Stage IV</u>	Il tumore invade la mucosa rettale o vescicale e/o organi a distanza.
IVA	Coinvolgimento della mucosa del retto o della vescica
IVB	Metastasi intra- o extra-addominali (inclusi I linfonodi inguinali)

*Adattato da Pecorelli S, Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix and endometrium. Int J Gynecol Obstet 2009 May;105(2):103-4 [38].*

Come si evince dalla Tabella 2, l'esame anatomo-patologico successivo all'asportazione chirurgica di utero e annessi (accompagnata anche dalla linfadenectomia pelvica e lombo-aortica) appaiono come il modo più appropriato per valutare la diffusione di malattia (e quindi lo stadio) nel carcinoma endometriale.

Già nel 1987 il Gynecologic Oncology Group (GOG) con lo studio GOG-33 aveva dimostrato che le pazienti con invasione miometriale assente o superficiale hanno una bassa probabilità di diffusione della malattia ai linfonodi [39]. Pertanto, è improbabile che la linfadenectomia in queste pazienti comporti un qualche beneficio, a

fronte dell'aumento di rischio di complicanze legate al trattamento. Più recentemente è stato dimostrato che le pazienti con grading 1 o 2 e invasione miometriale superficiale hanno una probabilità nulla di avere metastasi linfonodali se il tumore ha un diametro < 2 cm (Tabella 3) [40].

**Tabella 3.** *Pazienti a basso rischio di metastasi linfonodali (Invasione Miometriale <50%, Grado 1-2, Istotipo Endometrioido o nessuna evidenza macroscopica di tumore al di fuori dell'utero), stratificate in base al diametro tumorale e alle metastasi linfonodali.*  
Modificato da Mariani et al. Am J Obstet Gynecol 2000;182:1506-19 [40].

<i>Metastasi ai Linfonodi Pelvici</i>			
<u>Diametro Tumorale</u>	<u>Pazienti (N)</u>	<u>Linfadenectomia Pelvica, (N)</u>	<u>Linfonodi Pelvici Positivi (N)</u>
≤2 cm	123	59	0
>2 cm	169	107	8

L'effettuazione della linfadenectomia pelvica in tutte le pazienti comporta l'identificazione di un basso tasso di positività linfonodale [41]. Al contrario, la selezione di pazienti con rischio elevato di metastasi ai linfonodi e l'effettuazione di una linfadenectomia sistematica sia nell'area pelvica che lombo-aortica permette l'identificazione di positività linfonodale nel 22% dei casi e contemporaneamente risparmia inutili procedure di staging al 27% delle pazienti [42]. In generale, il 67% delle pazienti che hanno metastasi linfonodali ha linfonodi positivi nell'area para-aortica ed il 16% ha metastasi isolate in questa regione (Tabella 4) [42]. Inoltre, il 60% delle pazienti con coinvolgimento linfonodale nell'area al di sopra della arteria mesenterica inferiore ha linfonodi negativi nell'area sotto-mesenterica omolaterale [42]. Questi dati

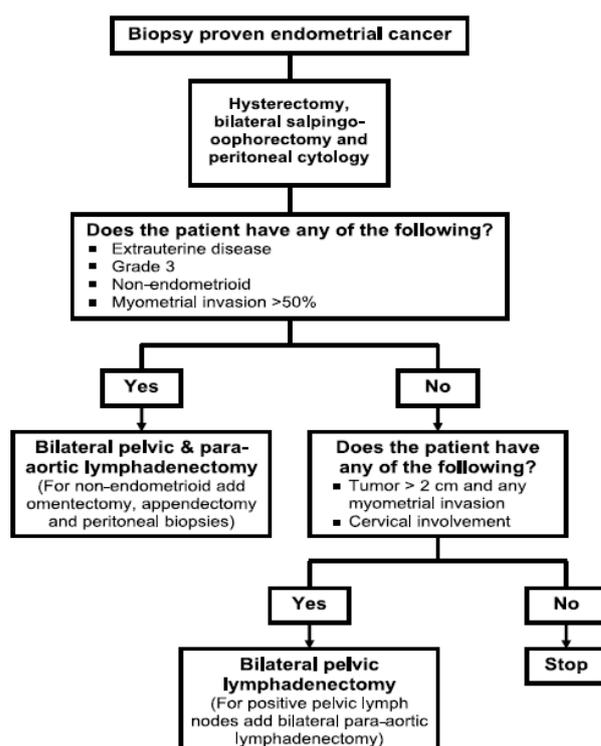
suggeriscono che, quando la dissezione linfonodale para-aortica è considerata necessaria, essa dovrebbe essere estesa fino al livello delle vene renali.

**Tabella 4.** Frequenza di metastasi linfonodali nell'area pelvica e para-aortica (o entrambe) nelle pazienti che sono state candidate a linfadenectomia sistematica pelvica e lomboaortica.

Da Mariani A, et al. *Gynecol Oncol.* 2008;109:11-8 [42].

Sede di Metastasi Linfonodale	Pazienti con linfadenectomia (N=57)	
	Positive (N)	Positive (%)
Solo Regione Pelvica	19	33%
Regioni Pelvica e Lomboaortica	29	51%
Solo Regione Lomboaortica	9	16%

Recentemente sono stati proposti diversi algoritmi al fine di identificare le pazienti con carcinoma endometriale che possono essere candidate alla linfadenectomia. In Figura 2 mostriamo la flow-chart in uso presso la Mayo Clinic di Rochester, Minnesota (USA), uno dei centri più importanti al mondo nell'ambito della ginecologia oncologica [43].



**Figura 2.** Protocollo per il management chirurgico del carcinoma endometriale presso la Mayo Clinic, Rochester, MN. Da Mariani et al. *Int J Gynecol Cancer* 2010;20:S52-54 [43].

## **TERAPIA**

### **Trattamento chirurgico**

L'isterectomia con annessiectomia bilaterale rappresenta certamente il passaggio fondamentale nell'ambito del trattamento del carcinoma endometriale. A fianco della chirurgia tradizionale a cielo aperto o della chirurgia effettuata per via vaginale, sono state introdotte piuttosto recentemente delle nuove modalità di accesso alla cavità addominale (la chirurgia laparoscopica e robotica) che appaiono ridurre la morbilità legata al trattamento di questa neoplasia [48-51]. L'approccio chirurgico più adeguato per curare il tumore maligno dell'endometrio è stato a lungo materia di dibattito scientifico. Nel 2009 sono stati pubblicati i dati peri-operatori di un vasto studio randomizzato su 2413 pazienti promosso dal GOG (studio noto come LAP2) [48-49]. Questo trial ha dimostrato che la chirurgia laparoscopica si associa a minori complicanze e ad una più breve degenza post-operatoria rispetto all'approccio tradizionale laparotomico [48-49]. Su questo studio sono state sollevate diverse perplessità riguardo l'elevato tasso di conversioni da laparoscopia a chirurgia a cielo aperto (25.8%): è stato obiettato infatti che probabilmente molti centri che hanno partecipato al reclutamento delle pazienti non avevano un adeguato background laparoscopico. Al contrario, un altro ampio trial randomizzato australiano su 332

donne (noto come LACE) [50] ha evidenziato un tasso di conversione decisamente più basso (3.7%), comparabile per altro ai dati di serie randomizzate più piccole, pubblicate in precedenza da centri con adeguata esperienza nell'ambito della chirurgia mini-invasiva [44-45]. Sia il LAP2 che il LACE hanno comunque dimostrato che la chirurgia endoscopica si associa ad una minore probabilità di complicanze post-operatorie ed a una migliore qualità di vita dopo il trattamento [49-50]. Bisogna tuttavia sottolineare alcuni importanti aspetti: il LAP2 richiedeva uno staging chirurgico completo (comprensivo di linfoadenectomia pelvica e lombo-aortica) in tutti i casi, indipendentemente dai dati isto-patologici della neoplasia; al contrario il LACE permetteva di omettere la linfoadenectomia a discrezione del chirurgo, sulla base del BMI della paziente, della presenza di comorbilità e delle caratteristiche del tumore (solo la metà delle pazienti infatti è stata sottoposta a dissezione retroperitoneale). Inoltre, il reclutamento del LAP2 è iniziato nel 1996, quando la laparoscopia era ancora in uno stadio di sviluppo iniziale della sua evoluzione ed i chirurghi non avevano ancora sviluppato tutta quella dimestichezza con questa tecnica che poi è stata acquisita nel momento in cui è stato cominciato il trial LACE (nell'anno 2005).

Ancora più rilevante rispetto ai risultati peri-operatori è l'impatto a lungo termine della laparoscopia sulla sopravvivenza libera da malattia e sulla sopravvivenza totale. Dopo alcuni risultati confortanti provenienti dagli studi di coorte, nel 2012 sono stati pubblicati i risultati a lungo termine del LAP2 e del LACE che hanno confermato la sicurezza della chirurgia laparoscopica anche in termini di outcome oncologici [52-53]. Al momento sembra si possa affermare che la laparoscopia dovrebbe costituire la prima scelta per la terapia chirurgica del carcinoma endometriale.

Negli ultimi anni, al di là della scelta della via di accesso, l'argomento più controverso riguardo il trattamento di questa neoplasia appare essere la scelta sull'esecuzione o meno della linfadenectomia e sulla sua utilità [54-55]. Nel 2009 sono stati pubblicati due trial randomizzati (lo studio LINCE e l'ASTEC trial) che hanno confrontato la sola isteroannessetomia bilaterale con l'esecuzione della linfadenectomia pelvica in aggiunta al classico staging con asportazione di utero ed annessi, in termini di sopravvivenza a cinque anni [41-56]. Questi studi non hanno dimostrato alcun vantaggio in termini di outcome oncologico a fronte di un aumentato tasso di complicanze peri-operatorie per il braccio in cui era stata eseguita la linfadenectomia. Entrambi i lavori tuttavia sono pesantemente limitati da diversi bias. In particolare entrambi

proponevano come staging linfonodale la sola dissezione pelvica, mentre la linfadenectomia lomboaortica era lasciata nello studio LINCE alla discrezione dei diversi centri e nell'ASTEC trial era completamente omessa. Inoltre, il dato della positività o negatività dei linfonodi non era utilizzato per guidare la scelta del trattamento adiuvante post-operatorio. Infine, nello studio ASTEC, l'esiguo numero di linfonodi asportati lascia chiaramente intendere che la dissezione a livello pelvico era limitata ad un semplice sampling e non una linfadenectomia sistematica.

Una conferma della necessità di uno studio più appropriato da riservare al ruolo reale di una linfadenectomia sistematica ed appropriatamente estesa per il carcinoma endometriale deriva dai risultati di un lavoro retrospettivo giapponese (SEPAL study) [57]. In quello studio, la linfadenectomia sistematica sia pelvica che lomboaortica aveva garantito una sopravvivenza superiore rispetto alla sola linfadenectomia pelvica, soprattutto nei casi di tumore ad alto rischio di recidiva.

### **Trattamento post-operatorio**

Nel trattamento adiuvante la radioterapia (esterna o intra-cavitaria) e la chemioterapia si sono dimostrate, da sole o in combinazione, in grado di ridurre la recidiva di malattia [4]. Il regime terapeutico

ottimale deve ancora essere stabilito e diversi studi sono in corso per accertare lo schema più appropriato.

## **BIOMARCATORI NEL CARCINOMA ENDOMETRIALE**

Il progresso nella conoscenza dei meccanismi di progressione neoplastica a livello cellulare e molecolare ha determinato un incremento dell'interesse nei confronti di terapie individualizzate con farmaci diretti contro specifici target per le donne con carcinoma dell'endometrio. Comprendere il profilo di rischio di una paziente affetta da questa neoplasia significa proporre un approccio terapeutico più mirato, aumentando la probabilità di efficacia del trattamento, diminuendo gli effetti collaterali e migliorando il rapporto costo-beneficio.

La stratificazione delle pazienti può essere effettuata grazie all'impiego dei biomarcatori. Questi ultimi sono stati definiti dal Biomarkers Definition Working Group come “una caratteristica che è oggettivamente misurata e valutata come un indicatore di normali processi biologici, processi patogenetici o risposta ad interventi terapeutici” [58]. Pertanto, le caratteristiche cliniche ed istologiche (incluso lo stato linfonodale che appare un fattore predittivo indipendente estremamente importante), così come alterazioni nelle indagini di imaging o molecolari sono tutti considerabili dei biomarcatori nell'ambito del carcinoma endometriale.

### *In-situ biomarkers*

Lo studio del tessuto tumorale è fondamentale per comprendere la sua aggressività e le implicazioni prognostico-terapeutiche. Nel caso del carcinoma endometriale abbiamo il materiale della biopsia pre-operatoria e, pressoché sempre, anche il pezzo definitivo dopo isterectomia. Tuttavia, sfortunatamente solo pochi biomarcatori sono stati studiati in modo prospettico ed in studi multicentrici.

Come già accennato, la stratificazione in tipo I e tipo II sulla base della diagnosi istologica fornisce una indicazione estremamente interessante riguardo la storia naturale della neoplasia ed anche le sue anomalie a livello cromosomico, genetico e molecolare [59].

Anche la presenza o meno dei recettori per gli steroidi sessuali (estrogeni e progesterone) si è dimostrata fortemente correlata con la prognosi del tumore e con la probabilità di metastasi [59]. L'espressione dei recettori per gli ormoni infatti si associa ad un basso grading, ad una istologia endometriode e ad una prognosi più favorevole. E' interessante sottolineare come vi sia una sostanziale coincidenza tra le analisi sullo stato recettoriale condotte sulla biopsia pre-operatoria rispetto a quelle sul pezzo definitivo [60-63].

L'aneuploidia è stata associata ad una prognosi tendenzialmente infausta in diversi studi. Tuttavia il ruolo di una possibile analisi

estensiva di questo parametro in ambito clinico non è mai stato validato [64-66].

La valutazione dell'attività proliferativa delle cellule di carcinoma endometriale si è dimostrata in correlazione con l'andamento della malattia, soprattutto quando valutata sul pezzo dell'isterectomia [67-69].

Tra gli oncogeni, l'iperespressione di *ERBB2* è stata associata ad una riduzione della sopravvivenza [70-71]. L'oncoproteina *statmina* è nota per la promozione dell'instabilità dei microtubuli, della proliferazione cellulare, della meta statizzazione e dell'insensibilità alla terapia anti-microtubulare. La sua iperespressione è stata correlata con l'attivazione di *PI3K* e con un fenotipo aggressivo sia nel tumore endometriale che in altre patologie neoplastiche [71-73].

Studi retrospettivi hanno evidenziato un effetto dell'iperespressione di p53 e p16 sull'outcome del carcinoma endometriale, sebbene non sempre indipendente dall'istotipo o da altri fattori prognostici [59].

La Tabella 5 riassume e fornisce dati quantitativi sui vari biomarker in situ studiati nell'ambito del carcinoma dell'endometrio.

**Tabella 5.** Effetto dei biomarker nel carcinoma endometriale pre la predizione pre-operatoria della presenza di malattia extra-uterina e valore post-operatorio in termini di sopravvivenza. Da Salvesen HB, et al. *Lancet Oncol.* 2008;13:e353-61 [biomarkers EC].

	Patient with extrauterine disease*	Decrease in 5-year survival	
		Preoperative biopsy	Hysterectomy specimens
Non-endometrioid histology <sup>2,47,56</sup>	50%	23%	40%
Grade 3 <sup>47,56,65</sup>	11-18%	17%	28%
Vascular invasion <sup>28,65</sup>	20%	NR	30%
Loss of ER/PR expression <sup>†43,58</sup>	24-27%	30%	20-30%
P53 overexpression <sup>48,56,66,68</sup>	23-49%	21-38%	30%
Loss of CDKN2A expression <sup>48,49</sup>	16%	35%	34%
High proliferation rate <sup>‡55,65,66,68</sup>	20-25%	13-26%	16%
Stathmin overexpression <sup>9,47</sup>	5-10%	11%	19-21%
ERBB2 overexpression <sup>44,55,56,68</sup>	7-17%	10-18%	20-52%
Aneuploidy <sup>54,56,57,68</sup>	22-25%	12-22%	19%

The increase (%) of patients with extrauterine disease at diagnosis, and decrease in 5-year survival (%) on the basis of preoperative and postoperative assessments of biomarkers are shown. References 47 and 57 were prospective studies. NR=not reported. ER=oestrogen receptor. PR=progesterone receptor. \*Including patients with lymph-node metastases. †Immunohistochemical staining with staining index  $\leq 3$  defined as loss. ‡MKI67 antigen identified by monoclonal antibody Ki-67.

### **Biomarker circolanti**

La misurazione di proteine circolanti offre una strategia molto interessante, per via della facilità di accesso al campione biologico e la possibilità di eseguire misurazioni ripetute nel tempo, attraverso sistemi di analisi automatizzati.

Alti livelli di CA 125, calprotectina e Growth Differentiation Factor (GDF) 15 in campioni ematici di pazienti affette da carcinoma endometriale sono stati correlati ad una maggiore aggressività della patologia [59]. Ulteriori studi sono però necessari per esplorare questo promettente campo di ricerca.

Ultimamente è emerso un interesse nei confronti del fibrinogeno come potenziale marcatore di diffusione della malattia e di prognosi

nell'ambito del carcinoma endometriale. La presente ricerca si focalizza proprio su questo nuovo, semplice e facilmente accessibile biomarker.

## **FIBRINOGENO E TUMORI MALIGNI EPITELIALI**

Il fibrinogeno è una proteina che circola nel sangue ad una concentrazione compresa circa tra 200 e 380 mg/dL, con una emivita di circa 4 giorni [74]. Gioca un ruolo nella risposta infiammatoria acuta, e aumenta la sua concentrazione in risposta alla maggior parte delle lesioni tissutali, infezioni o infiammazioni. La molecola nativa pesa 340 kDa ed è un omodimero; ciascuno dei due monomeri è costituito da tre catene polipeptidiche diverse ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) sintetizzate nel fegato a partire da geni differenti e collegate tra loro da ponti disolfuro [75].

L'associazione tra i tumori ed i componenti sia della risposta infiammatoria che della cascata coagulativa è nota da tempo. E' stato dimostrato che diversi fattori procoagulanti, infiammatori e fibrinolitici sono iperespressi in diversi modelli sperimentali così come in tumori umani [76-78]. Tra questi fattori vi è anche il fibrinogeno, il quale rappresenta in fisiologia il principale responsabile della formazione di quei ponti che consolidano una iniziale concrezione di piastrine in un solido coagulo con funzione emostatica [74]. Il fibrinogeno però ha anche tutta una serie di proprietà funzionali che esulano dal solo ruolo nei processi di emostasi: esso rappresenta un componente importantissimo della matrice extra-cellulare e media i processi di adesione tra le cellule.

Recentemente, il fibrinogeno è stato riscontrato nella matrice extracellulare di numerosi tumori solidi [76-78]. Inoltre, diversi studi clinici hanno dimostrato che elevati livelli di sostanze pro-coagulanti correlano con una prognosi peggiore in ambito oncologico. Il livello di fibrinogeno pre-operatorio è stato ipotizzato come strumento di stratificazione del rischio in pazienti sottoposte a chirurgia oncologica.

L'esatto motivo dell'osservato aumento del fibrinogeno in certi tumori deve tuttavia essere ancora determinato. La sua elevazione potrebbe essere semplicemente la spia di una risposta infiammatoria sistemica determinata dalla presenza della neoplasia: il tumore infatti è stato descritto come "una ferita che non guarisce" [79]. Secondo tale spiegazione dunque, il fegato incrementerebbe la sua produzione di fibrinogeno in risposta alla presenza del tumore, nel tentativo di stimolare la risposta immunitaria e quindi il suo ruolo sarebbe limitato a quello di un semplice marcatore di maggiore aggressività nel comportamento biologico della patologia. Recentemente però sono state avanzate delle ipotesi che indicano come il fibrinogeno possa avere una funzione attiva nella diffusione del tumore. Esistono numerose dimostrazioni *in vitro* che le cellule tumorali possono produrre fibrinogeno, e recentemente la presenza di mRNA che codifica per le diverse catene di questa proteina è stata dimostrata

anche *in vivo* in pazienti con tumore della cervice uterina, dell'intestino e del polmone [80-81]. E' stato evidenziato che in topi knock-out per il gene del fibrinogeno si osserva una netta riduzione del potere metastatico dei tumori [82]. Esistono poi dimostrazioni sperimentali che aggregati tra fibrinogeno, piastrine e cellule tumorali agirebbero come involucro che ricopre le cellule tumorali consentendo loro di eludere la sorveglianza immunitaria [83]. Inoltre, questa proteina si lega a fattori di crescita che inducono la proliferazione tumorale, come ad esempio il Fibroblast Growth Factor 2 [84]. Infine, il fibrinogeno interagisce con una serie di recettori delle integrine a livello delle cellule carcinomatose e delle cellule immunitarie. Questi processi potrebbero portare più facilmente le cellule tumorali ad aderire ai tessuti dell'organismo favorendo pertanto l'invasione locale o a distanza [84].

Nell'insieme questi dati suggeriscono che esiste una importante iter-relazione tra il fibrinogeno, i tumori ed il loro potenziale di aggressività biologica.

## **IL FIBRINOGENO NEL CARCINOMA ENDOMETRIALE:**

### **RISULTATI DEGLI STUDI CLINICI**

In ambito ginecologico, un elevato livello di fibrinogeno circolante è stato messo in correlazione con una prognosi peggiore sia per quanto riguarda il carcinoma della cervice che per quanto riguarda il carcinoma dell'ovaio [85-87].

Nel 2010 due studi clinici [88-89], di cui uno condotto dal nostro gruppo di ricerca, hanno investigato il ruolo del fibrinogeno come biomarcatore per il carcinoma endometriale. I due studi arruolavano un totale di 573 pazienti, nelle quali era stata dosata la concentrazione ematica di fibrinogeno prima dell'isteroannessetomia. Entrambi gli studi hanno evidenziato che una condizione di iperfibrinogenemia pre-operatoria (definita come concentrazione di fibrinogeno plasmatica  $> 380$  mg/dL) si correlava in modo significativo ad uno stadio più avanzato di malattia e ad una sopravvivenza peggiore sia in termini di disease-free che di overall survival.

E' molto interessante notare come poi, nel gruppo di carcinomi endometriali di tipo I, il rischio di positività linfonodale era decisamente maggiore, all'aumentare del livello di fibrinogeno. In particolare, grazie alla costruzione di curve ROC, è stato possibile identificare un livello di fibrinogenemia  $> 410$  mg/dL come il cut-off

oltre il quale il rischio di metastasi ai linfonodi aumenta con un odds ratio di 3.6 (95%CI: 1.1 – 11.7) [88].

## **SCOPO DELLO STUDIO**

I risultati degli studi clinici sono concordi nell'identificare un'associazione tra alti livelli di fibrinogeno e maggiore aggressività della malattia carcinomatosa endometriale. D'altra parte il fibrinogeno rappresenterebbe un biomarcatore ideale di stadio di malattia, coinvolgimento linfonodale e prognosi per questo tipo di patologia, dal momento che il suo dosaggio è poco costoso e viene effettuato di routine durante gli accertamenti pre-operatori.

Rimane però tuttora non chiarito se l'elevazione dei livelli di fibrinogeno sia legata all'aumento di produzione da parte del fegato, oppure se sia il tumore stesso in grado di sintetizzare e secernere questa importante proteina della cascata coagulativa.

Scopo del presente studio è stato quello di verificare, attraverso analisi immunoistochimiche e molecolari, l'espressione di fibrinogeno in campioni di carcinoma dell'endometrio. I risultati sono stati poi messi in relazione con i dati clinico-patologici delle pazienti.

## **MATERIALI E METODI**

Nel periodo compreso tra Novembre 2010 ed Aprile 2011, tutte le donne operate per carcinoma endometriale presso la Clinica Ostetrica e Ginecologica dell'Università dell'Insubria sono state incluse nella presente ricerca ed hanno costituito il nostro gruppo di studio. Lo staging chirurgico di questa neoplasia prevede, presso il nostro Centro, l'esecuzione di washing peritoneale, isterectomia totale, annessiectomia bilaterale e linfadenectomia pelvica sistematica bilaterale. In caso di tumori di tipo II con diagnosi istologica sulla biopsia pre-operatoria, si aggiunge anche l'esecuzione della omntectomia infracolica totale ed eventualmente della linfadenectomia lombo-aortica sotto- e sopra-mesenterica.

Il gruppo di controllo è costituito da donne sottoposte ad isterectomia totale (con o senza annessiectomia bilaterale) per patologia benigna in un rapporto di 1:4 rispetto ai casi di patologia maligna. Dal gruppo dei controlli sono state escluse tutte le pazienti che avevano subito l'intervento chirurgico per iperplasia endometriale (in quanto condizione di precancerosi endometriale o addirittura di coesistenza con patologia maligna e quindi potenziale fonte di bias per la presente analisi).

Nel gruppo di studio, dopo la rimozione del pezzo operatorio dall'addome, l'utero è stato aperto ed il tumore è stato identificato

macroscopicamente. A fresco è stato prelevato un campione del tessuto tumorale che è stato suddiviso simmetricamente in due parti, una delle quali è stata fissata e inclusa per il controllo istologico del materiale e per lo studio immunoistochimico, mentre la seconda è stata posta in RNAlater solution per l'esecuzione delle indagini molecolari.

L'utero, gli annessi e i linfonodi sono stati sottoposti all'esame istopatologico di routine per la diagnosi, la tipizzazione, il grading e la stadiazione della neoplasia. Anche per quanto riguarda i controlli l'utero è stato aperto a fresco ed è stato eseguito un prelievo casuale di endometrio che poi è stato posto in RNAlater solution per le analisi molecolari. Il resto del pezzo è stato inviato per l'analisi istologica di routine e le determinazioni immunoistochimiche.

Dati clinici completi sono stati raccolti sia per i casi che per i controlli, ed includevano le caratteristiche demografiche delle pazienti, i dati chirurgici e quelli oncologici. Lo stadio del tumore, il suo grado, la presenza di invasione degli spazi linfo-vascolari, la presenza di metastasi linfonodali ed il risultato della citologia peritoneale sono stati registrati nel dettaglio.

### *Analisi immunoistochimica*

L'analisi immunoistochimica è stata eseguita sia sui casi che sui controlli utilizzando un antisiero policlonale prodotto in coniglio, diretto contro fibrinogeno derivato da plasma umano (DakoCytomation #A0080, Carpinteria, CA, USA). In particolare, dalle inclusioni in paraffina di ogni campione sono state ottenute sezioni dello spessore di 3  $\mu\text{m}$  che sono state raccolte su vetrini carichi positivamente e poste in stufa a 60° C per un'ora. Le sezioni sono poi state paraffinate in xylene e in una scala di etanolo a gradazioni decrescenti. Le perossidasi endogene sono state inibite incubando le sezioni con perossido di idrogeno 3% per 5 minuti. Successivamente è stato eseguito un pretrattamento proteasico con una soluzione di Tripsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) allo 0,05% per 10' al fine di un migliore smascheramento antigenico.

Le sezioni sono state incubate con anticorpo primario anti-fibrinogeno, prodotto in coniglio, alla diluizione 1:100 per una notte a 4°.

Successivamente è stato applicato un anticorpo secondario anti-coniglio biotinilato (Vector, Burlingame, CA, USA) per un'ora a temperatura ambiente. L'amplificazione è stata ottenuta con sistema polimerico ULTRAVISION HRP (Bioptica, LabVision Corporation,

Freemont, CA, USA) secondo le opportune istruzioni. La reazione è stata sviluppata con 3-3' DAB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA).

Le sezioni sono state quindi contro-colorate con ematossilina di Harris, disidratate utilizzando gradazioni crescenti di etanolo e montate con vetrini coprioggetto.

La colorazione immunohistochimica è stata considerata positiva se più del 5% delle cellule appariva colorato. E' stato poi attribuito uno score semi-quantitativo di positività a seconda della intensità e della quantità di cellule positive alla colorazione (lieve [+], moderato [++] o intenso [+++]). L'immunoreattività è stata valutata considerando separatamente la componente epiteliale e la componente stromale (stroma endometriale, miometrio, vasi, connettivo)

### *Analisi molecolare*

Per l'analisi molecolare è stato isolato e purificato da ciascun campione l'RNA totale contenuto nel prelievo di tessuto. Mediante metodica di reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) e l'utilizzo di primers specifici (per la catena  $\alpha$  GGGCACATTTGAAGAGGTGT, TTGTGACCATCAGGACCAA; per la catena  $\beta$  CTGTGGCCTACCAGGTGAAT, TGGTCCTGTTTTCTCCCATC; per la catena  $\gamma$  GAATTTTGGCTGGGAAATGA,ATCATCGCCAAAATCAAAG),

è stata ottenuta l'amplificazione di un frammento corrispondente al cDNA delle catene  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  del fibrinogeno. Come controllo interno, è stato amplificato un frammento del cDNA codificante la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH).

Mediante metodica di migrazione su gel di agarosio sono state poi separati gli amplificati, colorate con bromuro di etidio, e conseguentemente verificata l'espressione di una o più catene di fibrinogeno da parte delle cellule del campione asportato.

Sia i casi con patologia maligna, sia i controlli affetti da patologia benigna uterina sono stati sottoposti a questa analisi molecolare.

### *Analisi statistica*

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante l'utilizzo del programma GraphPad 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Il test D'Agostino Pearson è stato utilizzato in caso di analisi su variabili continue per verificare se queste sono state campionate da distribuzione Gaussiane o non-Gaussiane. Il test *t di Student* a due code è stato usato per comparazioni di variabili con distribuzione normale, laddove il test *u di Mann Whitney* a due code è stato effettuato nel caso di variabili con distribuzione non normale. Il *test di Fisher* è stato impiegato nelle comparazioni tra due variabili

categoriche. La significatività statistica è stata stabilita per un  $p < 0.05$ .

## **RISULTATI**

Nel presente studio sono state incluse in totale 20 donne, 16 casi di carcinoma endometriale (sottoposto a staging completo secondo il nostro protocollo) e 4 casi di donne operate per patologia benigna, nelle quali è stato effettuato un intervento di isterectomia totale con annessiectomia bilaterale. In tutte le pazienti l'operazione è stata eseguita in laparoscopia e non si è verificato nessun caso di conversione a chirurgia a cielo aperto.

Le caratteristiche demografiche dei casi e dei controlli sono riportate in Tabella 6. I dati riguardanti le caratteristiche anatomico-patologiche (inclusi lo stadio, l'istologia, il grading, l'invasione miometriale nelle pazienti oncologiche, o la diagnosi nel caso dei controlli), chirurgiche ed il follow-up delle donne arruolate sono riportati in Tabella 7.

*Tabella 6. Caratteristiche demografiche delle pazienti incluse nello studio (16 casi di carcinoma endometriale e 4 controlli affetti da patologia benigna).*

<b>Caratteristica</b>	<b>Casi (N=16)</b>	<b>Controlli (N=4)</b>	<b>P value</b>
<b>Età (anni)</b>	68 (42-85)	59.5 (44-72)	<0.01
<b>BMI</b>	29.9 (21.1-40)	22.8 (18-28.5)	<0.01
<b>Nullipare</b>	3 (18.8%)	1 (25%)	1.00
<b>Post-menopausa</b>	14 (87.5%)	3 (75%)	0.51
<b>Comorbilità mediche</b>	13 (81.3%)	3 (75%)	1.00
<b>Pregressi interventi chirurgici</b>	8 (50%)	2 (50%)	1.00

I dati sono espressi come numero assoluto (%) o come mediana (range).

**Tabella 7.** Caratteristiche anatomo-patologiche, cliniche, chirurgiche ed oncologiche delle pazienti incluse nello studio (16 casi di carcinoma endometriale e 4 controlli affetti da patologia benigna).

<b>Caratteristica</b>	<b>Casi (N=16)</b>	<b>Controlli (N=4)</b>	<b>P value</b>
<b>Istotipo</b>			-
- <b>Endometrioides</b>	15 (93.8%)	0	
- <b>Sieroso</b>	1 (6.2%)	0	
<b>Stadio</b>			-
- <b>IA</b>	9 (56.3%)	0	
- <b>IB</b>	4 (25%)	0	
- <b>II</b>	1 (6.2%)	0	
- <b>IIIC</b>	2 (12.5%)	0	
<b>Grading</b>			-
- <b>1</b>	6 (37.5%)	0	
- <b>2</b>	6 (37.5%)	0	
- <b>3</b>	4 (25%)	0	
<b>Invasione Miometriale</b>			-
- <b>M0</b>	1 (6.2%)	0	
- <b>M1</b>	8 (50%)	0	
- <b>M2</b>	7 (43.8%)	0	
<b>Fibromatosi uterina</b>	0	4 (100%)	-
<b>Perdite ematiche (mL)</b>	150 (0-300)	50 (10-50)	0.01
<b>Linfonodi asportati</b>	17 (8-30)	0	-
<b>Pazienti con Linfonodi positivi</b>	2 (12.5%)	0	-
<b>Complicanze intra-operatorie</b>	0	0	>0.99
<b>Complicanze post-operatorie</b>	0	0	>0.99
<b>Terapia adiuvante</b>	3 (18.8%)	0	-
<b>Follow-up (mesi)</b>	26 (20 – 30)	24 (20 – 30)	0.93
<b>Recidiva</b>	0	0	-

I dati sono espressi come numero assoluto (%) o come mediana (range).

Come prevedibile, visti i fattori di rischio del carcinoma endometriale, un numero superiore di donne anziane (età > 75 anni) ed obese (BMI  $\geq$  30) erano presenti nel gruppo dei casi rispetto ai controlli, ma senza che questi valori raggiungessero la significatività statistica.

L'istologia di gran lunga più frequentemente osservata è stata quella endometrioides (93.8%). Una perdita ematica maggiore è stata identificata nella popolazione dei casi rispetto ai controlli (150 vs. 50

mL), ma la differenza di soli 100 mL non appare clinicamente significativa.

Per quanto riguarda l'analisi immunoistochimica, un caso (6.2%) di carcinoma endometriale è risultato non valutabile per via della scarsità del campione pervenuto. Sono rimasti pertanto 15 casi per l'analisi finale, di cui 5 (33.3%) con positività alla PCR per almeno una delle catene di fibrinogeno. Tutti e 4 i controlli con patologia benigna hanno avuto uno staining immunoistochimico soddisfacente.

I risultati immunoistochimici sono riassunti in Tabella 8.

**Tabella 8.** Caratteristiche immunoistochimiche delle 19 pazienti incluse ed analizzabili (15 casi di carcinoma endometriale e 4 controlli affetti da patologia benigna).

		<i>Negative</i>	<i>Mild +</i>	<i>Moderate ++</i>	<i>Intense +++</i>
<b>CANCER</b> (N=16)	<i>Endometrium</i>	2 (13.3%)	1 (6.7%)	3 (20%)	9 (60%)
	<i>Stroma</i>	1 (6.7%)	2 (13.3%)	7 (46.7%)	5 (33.3%)
<b>BENIGN</b> (N=4)	<i>Endometrium</i>	1 (25%)	2 (25%)	1 (25%)	0 (0%)
	<i>Stroma</i>	0	0	1 (25%)	3 (75%)

In generale, in 12/16 pazienti affette da neoplasia (80%) è stata osservata espressione immunoistochimica di fibrinogeno a livello della componente epiteliale adenocarcinomatosa con score di reazione variabile da moderata ad intensa. Complessivamente il

fibrinogeno risultava espresso in modo significativamente più intenso nelle donne con carcinoma endometriale rispetto ai controlli. Infatti è stata osservata intensa positività epiteliale in 9/16 (60%) neoplasie vs. nessuno degli uteri di controllo ( $p = 0.03$ ).

In Tabella 9 è riportata la correlazione tra intensa positività alla reazione immunoistochimica a livello dell'epitelio endometriale e varie caratteristiche clinico-patologiche.

**Tabella 9.** Correlazione tra positività della reazione immunoistochimica a livello dell'epitelio endometriale (positività intensa,  $N=9$ ) e caratteristiche clinico-patologiche delle 15 pazienti affette da carcinoma dell'endometrio in cui è stata possibile l'analisi immunoistochimica.

<i>Caratteristica</i>	<i>Immunoistochimica pos. intensa (N=9)</i>	<i>Immunoistochimica negativa/pos. lieve- moderata (N=6)</i>	<i>P value</i>
<i>Diametro tumorale (mm)</i>	30 (10 – 50)	24 (3 – 54)	0.69
<i>Grading &gt; 1</i>	5 (55.6%)	4 (66.7%)	0.67
<i>Istotipo endometriode</i>	8 (88.9%)	6 (100%)	0.40
<i>Invasione miometriale profonda</i>	5 (55.6%)	2 (33.3%)	0.40
<i>Stadio &gt; IA</i>	5 (55.6%)	2 (33.3%)	0.40
<i>Fibrinogenemia &gt; 380 mg/dL</i>	2 (22.2%)	2 (33.3%)	0.24
<i>Positività linfonodale</i>	1 (11.1%)	1 (16.7%)	0.76

I dati sono espressi come numero assoluto (%) o come mediana (range).

Nessuno dei parametri clinico-patologici presi in considerazione in Tabella 9 ha dimostrato una associazione significativa con la positività alla reazione immunoistochimica. Tuttavia, considerando insieme le pazienti con positività epiteliale moderata ed intensa ( $N=12$ ), come in Tabella 10, si riscontrava invece una correlazione tendente alla significatività statistica tra il dato della reazione

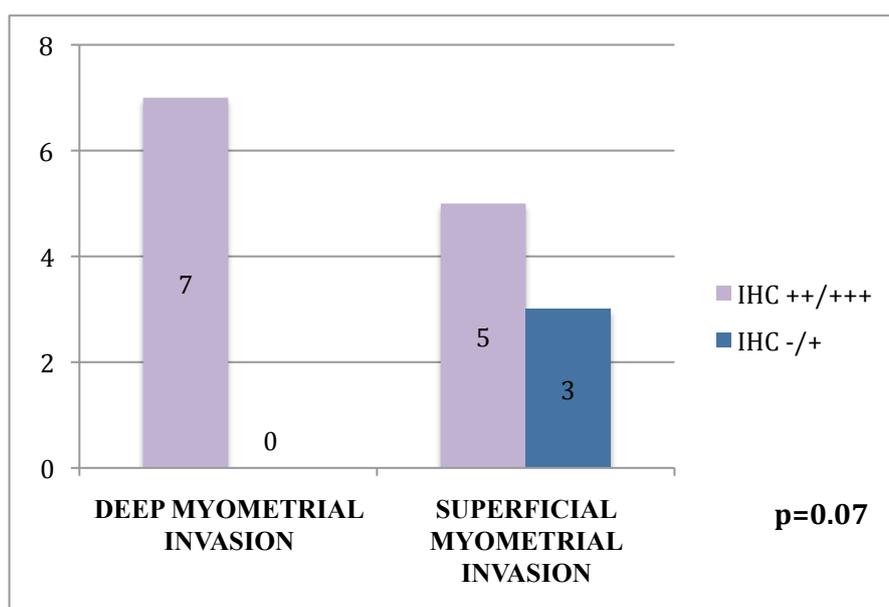
immunoistochimica e due indicatori di aggressività biologica del tumore (ovvero l'invasione miometriale profonda e lo stadio > IA, vedi Figura 3 e 4), pur con i limiti imposti dalla esiguità dei due sottogruppi considerati (12 vs. 3 casi).

**Tabella 10.** Correlazione tra positività della reazione immunoistochimica a livello dell'epitelio endometriale (positività moderata/intensa, N=12) e caratteristiche clinico-patologiche delle 15 pazienti affette da carcinoma dell'endometrio in cui è stata possibile l'analisi immunoistochimica.

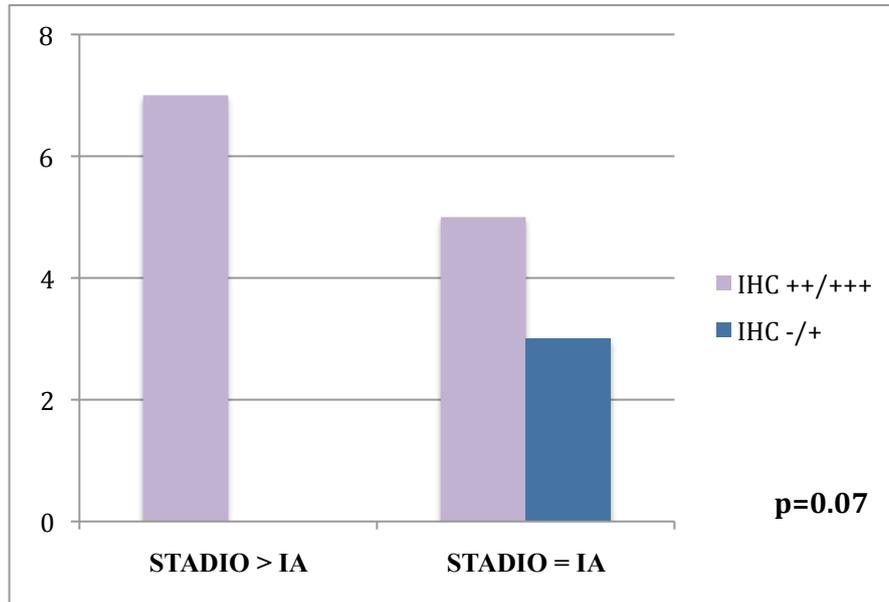
<i>Caratteristica</i>	<i>Immunoistochimica pos. moderata/intensa (N=12)</i>	<i>Immunoistochimica negativa/pos. lieve (N=3)</i>	<i>P value</i>
<i>Diametro tumorale (mm)</i>	30 (10 – 54)	9 (3 – 50)	0.29
<i>Grading &gt; 1</i>	7 (58.3%)	2 (66.7%)	0.79
<i>Istotipo endometriode</i>	11 (91.7%)	3 (100%)	0.60
<i>Invasione miometriale profonda</i>	7 (58.3%)	0 (0%)	0.07
<i>Stadio &gt; IA</i>	7 (58.3%)	0 (0%)	0.07
<i>Fibrinogenemia &gt; 380 mg/dL</i>	3 (25%)	1 (33%)	0.77
<i>Positività linfonodale</i>	2 (16.7%)	0 (0%)	0.44

I dati sono espressi come numero assoluto (%) o come mediana (range).

**Figura 3.** Correlazione tra positività immunoistochimica epiteliale moderata/intensa e invasione miometriale profonda

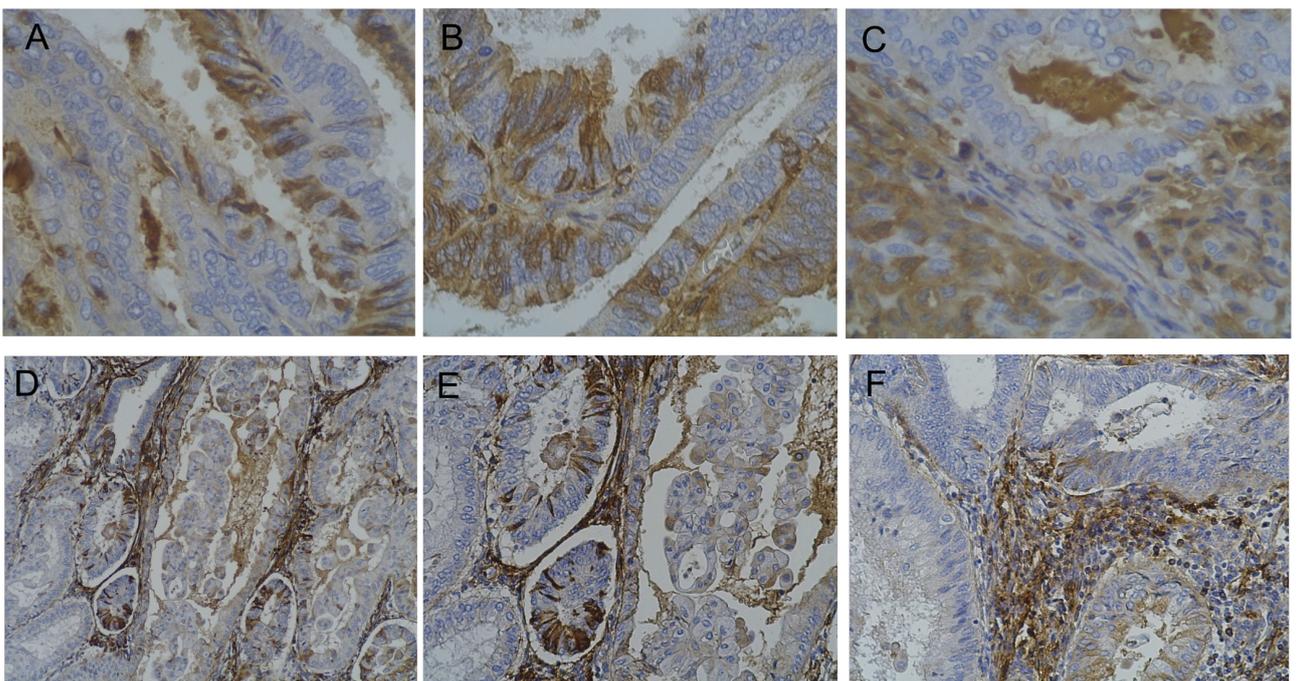


**Figura 4.** Correlazione tra positività immunoistochimica epiteliale moderata/intensa e Stadio di malattia.



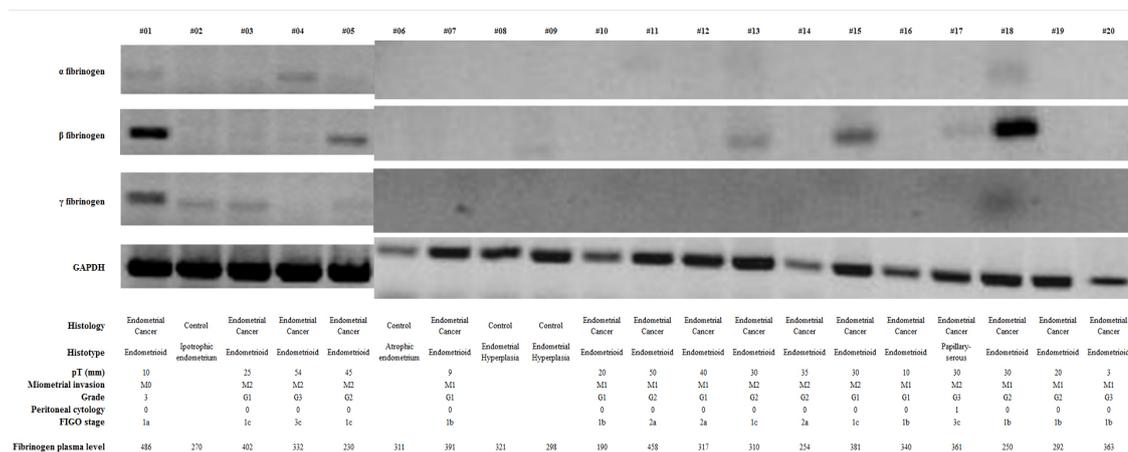
In Figura 5 sono raffigurati diversi gradi di positività epiteliale e stromale agli anticorpi anti-fibrinogeno.

**Figura 5.** Positività lieve (A), intensa (B) e moderata (basso a sinistra) (C) a livello epiteliale. In C positività anche del secreto luminale. Positività moderata a livello sia epiteliale che stromale (D), particolare di D (E) discreta positività stromale in area epiteliale negativa (F).



L'analisi molecolare invece è risultata eseguibile in tutte le 20 donne arruolate. I risultati sono mostrati in Figura 6.

**Figura 6.** Risultato dell'analisi molecolare.



Come atteso, GAPDH è risultata espressa in tutte le pazienti. Sei donne (37.5%) esprimevano almeno una delle catene del fibrinogeno nel gruppo delle pazienti con carcinoma endometriale vs. nessuna nel gruppo di controllo ( $p = 0.14$ ).

La correlazione tra positività alla RT-PCR e vari parametri clinico-patologici di aggressività del tumore, è riportata in Tabella 11.

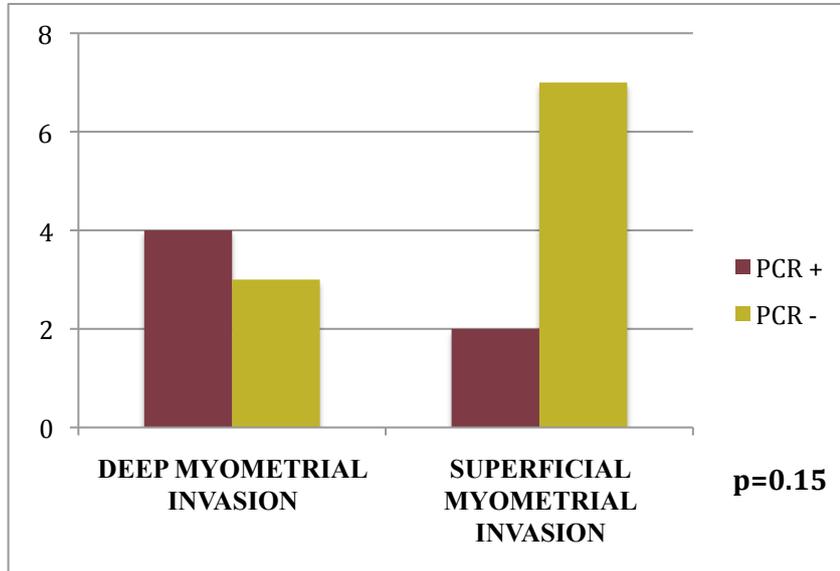
**Tabella 11.** Correlazione tra risultato della RT-PCR e caratteristiche clinico-patologiche.

<b>Caratteristica</b>	<b>RT-PCR pos (N=6)</b>	<b>RT-PCR neg (N=10)</b>	<b>P value</b>
<b>Diametro tumorale (mm)</b>	30 (10 – 54)	22.5 (3 – 40)	0.26
<b>Grading &gt; 1</b>	5 (83.3%)	5 (50%)	0.16
<b>Istotipo endometrioid</b>	6 (100%)	9 (90%)	0.42
<b>Invasione miometriale profonda</b>	4 (66.7%)	3 (30%)	0.15
<b>Stadio &gt; IA</b>	4 (66.7%)	3 (30%)	0.15
<b>Fibrinogenemia &gt; 380 mg/dL</b>	2 (33.3%)	2 (20%)	0.59
<b>Positività linfonodale</b>	1 (16.7%)	1 (10%)	0.70

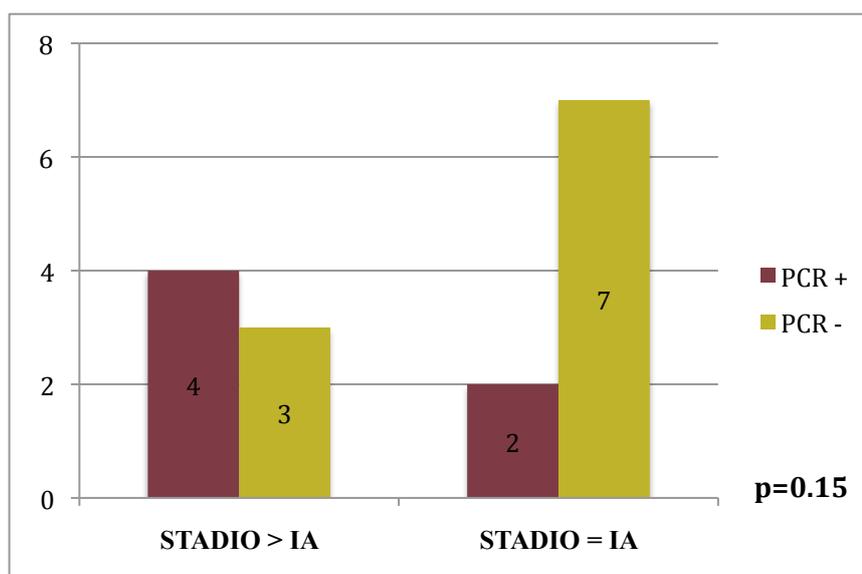
I dati sono espressi come numero assoluto (%) o come mediana (range).

Come evidenziato in Figura 7, la positività alla PCR per almeno una delle tre catene del fibrinogeno si correlava ad una maggior probabilità di invasione miometriale profonda (importante marker di aggressività del tumore), sebbene questa associazione non raggiunga la significatività statistica. La stessa cosa è stata riscontrata per gli stadi di malattia > IA, secondo la stadi azione FIGO del 2009 (vedi Figura 8) e per il grading > 1 (Figura 9).

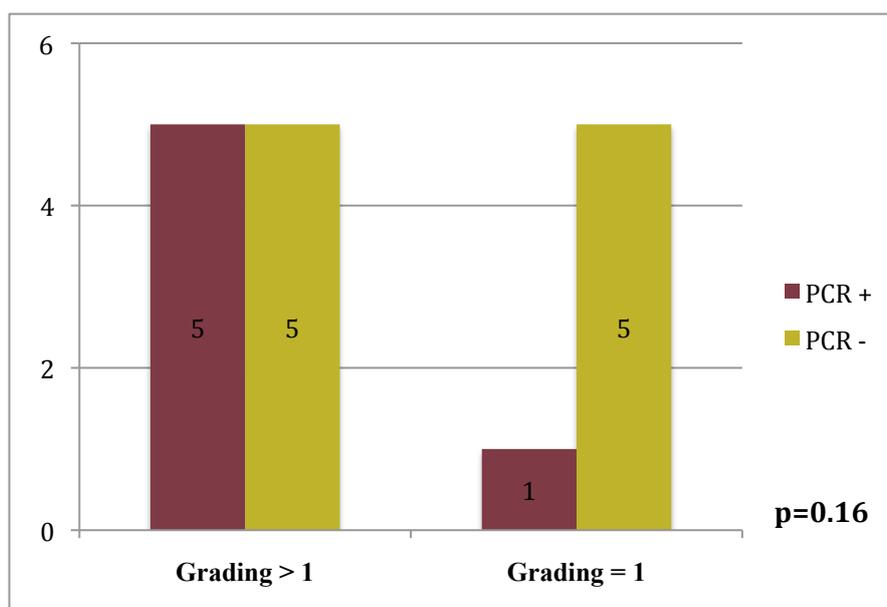
**Figura 7.** Correlazione tra PCR positiva e invasione miometriale profonda



**Figura 8.** Correlazione tra PCR positiva e stadio di malattia.



**Figura 9.** Correlazione tra PCR positiva e Grading > 1.



E' stata poi notata una associazione significativa tra positività all'analisi molecolare ed espressione del fibrinogeno valutata alla immunisto chimica: in particolare 5 (100%) dei 5 casi con RT-PCR positiva presentavano una positività moderata/intensa allo staining

con anticorpi anti-fibrinogeno ( $p < 0.001$ ), e 4/5 avevano una positività immunocistochimica giudicata intensa ( $p = 0.006$ ).

## **DISCUSSIONE**

Il presente studio mostra che all'interno di campioni provenienti da carcinoma endometriale è riscontrabile mRNA che codifica per catene di fibrinogeno, e che il fibrinogeno può essere espresso dalle cellule del tumore stesso, come dimostrato dalla positività della reazione immunohistochimica a livello delle cellule epiteliali che costituiscono il tumore. A quanto ci risulta, questo è il primo lavoro ad accertare che il tumore dell'endometrio è in grado di produrre *in vivo* fibrinogeno, almeno nella forma di una delle tre catene che lo costituiscono.

Due studi clinici hanno recentemente dimostrato che, se al riscontro di tumore dell'endometrio si associa iperfibrinogenemia, aumenta la probabilità di disseminazione extra-uterina della malattia con conseguente peggioramento della prognosi [88-89]. Entrambi gli articoli però sollevavano la domanda riguardo a quale fosse l'origine dell'aumento di questo mediatore della cascata coagulativa: in altre parole, non era ancora chiaro se l'aumento dei valori di fibrinogeno fosse dovuto ad una iperproduzione epatica o se fosse invece il tumore stesso a produrre tale proteina. Il presente studio sembra avvalorare questa seconda ipotesi: abbiamo infatti riscontrato mRNA codificante per almeno una delle tre catene di fibrinogeno nel 37.5% dei casi di tumore endometriale analizzati rispetto a nessuno dei

controlli. Inoltre, la positività immunoistochimica delle cellule epiteliali endometriali è risultata intensa solo nei casi ma non nei controlli. Questo risultato suggerisce che, mentre nella mucosa non neoplastica il fibrinogeno è assente o espresso a livelli minimi, l'espressione aberrante di tale molecola proteica risulta cospicua nel tessuto endometriale neoplastico. E' stata poi riscontrata una correlazione significativa tra positività dell'analisi molecolare con RT-PCR e staining immunoistochimico, a conferma che l'espressione della proteina nel citoplasma delle cellule endometriali appare aumentato nei casi in cui è stato riscontrato l'mRNA. Si può pertanto supporre che l'immunoreattività agli anticorpi anti-fibrinogeno possa essere effettivamente dovuta (almeno in parte) ad una reale produzione endogena delle cellule neoplastiche, per lo meno nei casi in cui quest'ultima è stata accertata con la RT-PCR.

Riconosciamo alcune limitazioni nella nostra analisi: il numero limitato di pazienti ci ha precluso una valutazione dettagliata della correlazione tra risultati molecolari, immunoistochimici e gli outcome clinico-oncologici, in particolare quelli a lungo termine. Sarebbe sicuramente interessante approfondire se anche la produzione di fibrinogeno da parte delle cellule di carcinoma endometriale (e non solo quindi il riscontro agli esami pre-operatori di una generica iperfibrinogenemia) sia correlata effettivamente con

una prognosi peggiore per le pazienti affette da questa neoplasia. Inoltre, i nostri dati non ci permettono di dimostrare con certezza che il fibrinogeno riscontrato in misura aumentata in talune pazienti prima della chirurgia sia davvero quello prodotto da parte delle cellule tumorali piuttosto che il risultato di una risposta infiammatoria generalizzata dell'organismo nei confronti del tumore, soprattutto se quest'ultimo manifesta un potenziale elevato di aggressività biologica.

Il meccanismo attraverso il quale la produzione di fibrinogeno sarebbe funzionale alla evoluzione della patologia cancerosa non è stato ancora accertato, tuttavia è stato recentemente dimostrato che il fibrinogeno sintetizzato dalle cellule di carcinoma promuove la crescita neoplastica attraverso la interazione con diversi fattori di crescita, tra cui sembra rivestire particolare importanza il Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) [90]. L'attivazione di pathway che coinvolgono fattori di crescita può essere uno dei modi in cui il fibrinogeno accelera la crescita della patologia carcinomatosa.

E' interessante notare come i nostri dati non solo dimostrano che il carcinoma dell'endometrio può esprimere mRNA codificante per catene di fibrinogeno, ma anche che alcuni indicatori di elevata aggressività tumorale si correlano con l'espressione di fibrinogeno da parte del tumore. Pur riconoscendo che l'esiguità dei dati limita il

potere delle nostre conclusioni e che la dimostrazione di una correlazione tra espressione di fibrinogeno e fattori prognostici va oltre l'intento del presente studio, abbiamo riscontrato una associazione tendenzialmente significativa ( $p = 0.07$ ) tra l'invasione miometriale profonda, lo stadio di malattia  $> IA$  e la positività (per lo meno moderata) allo staining immunoistochimico. Anche la positività alla RT-PCR sembrava mostrare una tendenza alla correlazione con questi 2 importanti marker di aggressività biologica del tumore, oltre che con un grading  $> 1$ , sebbene l'associazione statistica ( $p = 0.15$  e  $p = 0.16$ ) fosse lontana dalla significatività. In generale questi dati sembrano suggerire comunque l'esistenza di un legame tra fibrinogeno e potenziale di invasività del tumore e meritano una conferma in studi più ampi e disegnati a questo scopo.

Un'altra direzione di sicuro interesse per la ricerca futura è il tentativo di correlare l'aumento della fibrinogenemia pre-operatoria nelle pazienti con prognosi tendenzialmente peggiore e la produzione endogena da parte del tumore. In altre parole, si tratterebbe di verificare che il fibrinogeno circolante provenga, almeno in parte dal tumore e non dal fegato. Inoltre, potrebbe essere interessante verificare, con prelievi eseguiti a livello delle vene che drenano dall'utero, se il sangue che proviene dal carcinoma endometriale sia

più ricco in fibrinogeno (nativo o nelle sue forme aberranti costituite da solo una o due delle sue catene) rispetto alla restante circolazione.

## **CONCLUSIONI**

Il presente studio fornisce per la prima volta in letteratura evidenza che in alcune pazienti affette da carcinoma dell'endometrio è possibile riscontrare mRNA per almeno una delle tre catene che compongono il fibrinogeno e che questo tumore maligno può esprimere tale proteina all'interno del citoplasma delle cellule tumorali, suggerendo pertanto che questa neoplasia è verosimilmente in grado di produrre questo mediatore. Dal momento che è già stato precedentemente dimostrato che l'iperfibrinogenemia al momento del trattamento iniziale di questa neoplasia è un marker di maggiore aggressività del tumore, la nostra analisi avvalorza la tesi che la produzione di fibrinogeno da parte del tumore possa essere evolutivamente funzionale al processo neoplastico per sopravvivere ed invadere l'ospite, fornendo pertanto un possibile obiettivo per lo sviluppo di terapie molecolari, e per lo studio più approfondito della biologia del carcinoma endometriale.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:69-90.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* 2013;63:11-30.
3. Silverberg E, Lubera J. Cancer statistics, 1987. *CA Cancer J Clin.* 1987;37:2-19.
4. Uccella S, Mariani A. Endometrial cancers. *ESGO textbook of gynecologic oncology.* Gunes publishing; c2009, p. 173-8.
5. Meyer LA, Broaddus RR, Lu KH. Endometrial cancer and Lynch syndrome: clinical and pathologic considerations. *Cancer Control.* 2009;16:14-22.
6. Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I. Endometrial cancer. *Lancet.* 2005;366:491-505.
7. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:579-591.
8. Kaaks R, Lukanova A, Kurzer MS. Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk: a synthetic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11:1531-1543.
9. Parslov M, Lidegaard O, Klintorp S, et al. Risk factors among young women with endometrial cancer: a Danish case-control study. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182:23-29.
10. Potischman N, Hoover RN, Brinton LA, et al. Case-control study of endogenous steroid hormones and endometrial cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:1127-1135.
11. Weiderpass E, Persson I, Adami H-O, Magnusson C, Lindgren A, Baron JA. Body size in different periods of life, diabetes mellitus, hypertension, and risk of

- postmenopausal endometrial cancer (Sweden). *Cancer Causes Control* 11:185-92, 2000.
12. Je Y, Giovannucci E. Coffee consumption and risk of endometrial cancer: Findings from a large up-to-date meta-analysis. *Int J Cancer*. 2012;131:1700-10.
  13. Uccella S, Mariani A, Wang AH, Vierkant RA, Cliby WA, Robien K, Anderson KE, Cerhan JR. Intake of coffee, caffeine and other methylxanthines and risk of Type I versus Type II in the IWHS. *Br J Cancer* 2013. In press.
  14. Uccella S, Mariani A, Wang AH, Vierkant RA, Robien K, Anderson KE, Cerhan JR. Epidemiologic risk factors for type I versus type II endometrial cancer in the Iowa Women's Health Study (IWHS). Poster at the 17<sup>th</sup> International Meeting of the European Society of Gynecologic Oncology (ESGO). Milan – Italy, September 11<sup>th</sup> – 14<sup>th</sup> 2011.
  15. Uccella S, Mariani A, Wang AH, Vierkant RA, Robien K, Anderson KE, Cerhan JR. Dietary and supplemental intake of one-carbon nutrients and the risk of type I and type II endometrial cancer: a prospective cohort study. *Ann Oncol*. 2011;22:2129-2136.
  16. Sorosky JI. Endometrial Cancer. *Obstet Gynecol*. 2008;111:436-47.
  17. Bakkum-Gamez JN, Gonzalez-Bosquet J, Laack NN, Mariani A, Dowdy SC. Current issues in the management of endometrial cancer. *Mayo Clin Proc*. 2008;83:97-112.
  18. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Baak JP, Lees JA, Weng LP, Eng C. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:924-30.
  19. Mutter GL, Ince TA, Baak JP, Kust GA, Zhou XP, Eng C. Molecular identification of latent precancers in histologically normal endometrium. *Cancer Res*. 2001;61:4311-4.

20. Kim YB, Holschneider CH, Ghosh K, Nieberg RK, Montz FJ. Progestin alone as primary treatment of endometrial carcinoma in premenopausal women: report of seven cases and review of the literature. *Cancer*. 1997;79:320-327.
21. Levine RL, Cargile CB, Blazes MS, van Rees B, Kurman RJ, Ellenson LH. PTEN mutations and microsatellite instability in complex atypical hyperplasia: a precursor lesion to uterine endometrioid carcinoma. *Cancer Res*. 1998;58:3254-3258.
22. Mutter GL, Boynton KA, Faquin WC, Ruiz RE, Jovanovic AS. Allelotype mapping of unstable microsatellites establishes direct lineage continuity between endometrial precancers and cancer. *Cancer Res*. 1996;56:4483-4486.
23. Lax SF, Kendall B, Tashiro H, Slebos RJ, Hedrick L. The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways. *Cancer*. 2000;88:814-824.
24. Scholten AN, Creutzberg CL, van den Broek LJ, Noordijk EM, Smit VT. Nuclear beta-catenin is a molecular feature of type I endometrial carcinoma. *J Pathol*. 2003;201:460-465.
25. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sanchez C, et al. Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene*. 2002;21:7981-7990.
26. Mirabelli-Primdahl L, Gryfe R, Kim H, et al. Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. *Cancer Res*. 1999;59:3346-3351.
27. Zheng W, Cao P, Zheng M, Kramer EE, Godwin TA. p53 overexpression and bcl-2 persistence in endometrial carcinoma: comparison of papillary serous and endometrioid subtypes. *Gynecol Oncol*. 1996;61:167-174

28. Sonoda G, du Manoir S, Godwin AK, et al. Detection of DNA gains and losses in primary endometrial carcinomas by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997;18:115-125.
29. Niederacher D, An HX, Cho YJ, Hantschmann P, Bender HG, Beckmann MW. Mutations and amplification of oncogenes in endometrial cancer. *Oncology*. 1999;56:59-65.
30. Saffari B, Jones LA, Elnaggar A, Felix JC, George J, Press MF. Amplification and overexpression of HER-2/neu (c-erbB2) in endometrial cancers: correlation with overall survival. *Cancer Res*. 1995;55:5693-5698.
31. Mariani A, Dowdy SC, Keeney GL, Long HJ, Lesnick TG, Podratz KC. High-risk endometrial cancer subgroups: candidates for target-based adjuvant therapy. *Gynecol Oncol*. 2004;95:120-6.
32. Thomas M, Mariani A, Wright JD, Madarek EO, Powell MA, Mutch DG, Podratz KC, Dowdy SC. Surgical management and adjuvant therapy for patients with uterine clear cell carcinoma: a multi-institutional review. *Gynecol Oncol*. 2008;108:293-7.
33. Thomas MB, Mariani A, Cliby WA, Keeney GA, Podratz KC, Dowdy SC. Role of systematic lymphadenectomy and adjuvant therapy in stage I uterine papillary serous carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2007;107:186-9.
34. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafour A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ; American Cancer Society. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin*. 2004;54:8-29.
35. Mariani A, Dowdy SC, Keeney GL, Haddock MG, Lesnick TG, Podratz KC. Predictors of vaginal relapse in stage I endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2005;97:820-7.

36. Creutzberg CL, van Putten WL, Koper PC, et al.; PORTEC Study Group. Survival after relapse in patients with endometrial cancer: results from a randomized trial. *Gynecol Oncol.* 2003;89:201-9.
37. Elliott P, Green D, Coates A, et al. The efficacy of postoperative vaginal irradiation in preventing vaginal recurrence in endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 1994;4:84-93.
38. Pecorelli S, Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix and endometrium. *Int J Gynecol Obstet* 2009;105:103-4.
39. Creasman WT, Morrow CP, Bundy BN, Homesley HD, Graham JE, Heller PB. Surgical pathologic spread patterns of endometrial cancer. A Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer.* 1987;60:2035-41.
40. Mariani A, Webb MJ, Keeney GL, Haddock MG, Calori G, Podratz KC. Low-risk corpus cancer: is lymphadenectomy or radiotherapy necessary? *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182:1506-1519.
41. The writing committee on behalf of the ASTEC study group. Efficacy of systematic pelvic lymphadenectomy in endometrial cancer (MRC ASTEC trial): a randomised study. *Lancet.* 2009; 373:125-36.
42. Mariani A, Dowdy SC, Cliby WA, Gostout BS, Jones MB, Wilson TO, Podratz KC. Prospective assessment of lymphatic dissemination in endometrial cancer: a paradigm shift in surgical staging. *Gynecol Oncol.* 2008;109:11-8.
43. Mariani A, El-Nashar SA, Dowdy SC. Lymphadenectomy in endometrial cancer. Which is the right question? *Int J Gynecol Cancer.* 2010;20:S52-S54.
44. Palomba S, Falbo A, Mocchiato R, Russo T, Zullo F. Laparoscopic treatment for endometrial cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials (RCTs). *Gynecol Oncol.* 2009;112:415-21.

45. Ghezzi F, Cromi A, Bergamini V, Uccella S, Beretta P, Franchi M, Bolis P. Laparoscopic management of endometrial cancer in nonobese and obese women: A consecutive series. *J Minim Invasive Gynecol.* 2006;13:269-75.
46. Seamon LG, Cohn DE, Richardson DL, Valmadre S, Carlson MJ, Phillips GS, Fowler JM. Robotic hysterectomy and pelvic-aortic lymphadenectomy for endometrial cancer. *Obstet Gynecol.* 2008;112:1207-13.
47. Boggess JF, Gehrig PA, Cantrell L, Shafer A, Ridgway M, Skinner EN, Fowler WC. A comparative study of 3 surgical methods for hysterectomy with staging for endometrial cancer: robotic assistance, laparoscopy, laparotomy. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;199:360.e1-9.
48. Walker JL, Piedmonte MR, Spirtos NM, Eisenkop SM, Schlaerth JB, Mannel RS, et al. Laparoscopy compared with laparotomy for comprehensive surgical staging of uterine cancer: Gynecologic Oncology Group Study LAP2. *J Clin Oncol.* 2009;27:5331-6.
49. Kornblith AB, Huang HQ, Walker JL, Spirtos NM, Rotmensch J, Cella D. Quality of life of patients with endometrial cancer undergoing laparoscopic international federation of gynecology and obstetrics staging compared with laparotomy: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 2009;27:5337-42.
50. Janda M, Gebiski V, Brand A, Hogg R, Jobling TW, Land R, et al. Quality of life after total laparoscopic hysterectomy versus total abdominal hysterectomy for stage I endometrial cancer (LACE): a randomised trial. *Lancet Oncol.* 2010;11:772-80.
51. Ghezzi F, Cromi A, Uccella S, Siesto G, Giudici S, Serati M, Franchi M. Laparoscopic versus open surgery for endometrial cancer: a minimum 3-year follow-up study. *Ann Surg Oncol.* 2010;17:271-8

52. Walker JL, Piedmonte MR, Spirtos NM, Eisenkop SM, Schlaerth JB, Mannel RS, Barakat R, Pearl ML, Sharma SK. Recurrence and survival after random assignment to laparoscopy versus laparotomy for comprehensive surgical staging of uterine cancer: Gynecologic Oncology Group LAP2 Study. *J Clin Oncol.* 2012;30:695-700.
53. Obermair A, Janda M, Baker J, Kondalsamy-Chennakesavan S, Brand A, Hogg R, Jobling TW, Land R, Manolitsas T, Nascimento M, Neesham D, Nicklin JL, Oehler MK, Otton G, Perrin L, Salfinger S, Hammond I, Leung Y, Sykes P, Ngan H, Garrett A, Laney M, Ng TY, Tam K, Chan K, Wrede DH, Pather S, Simcock B, Farrell R, Robertson G, Walker G, McCartney A, Gebiski V. Improved surgical safety after laparoscopic compared to open surgery for apparent early stage endometrial cancer: results from a randomised controlled trial. *Eur J Cancer.* 2012;48:1147-53.
54. Uccella S, Podratz KC, Aletti GD, Mariani A. Lymphadenectomy in endometrial cancer. *Lancet.* 2009;373:1170.
55. Uccella S, Podratz KC, Aletti GD, Mariani A. Re: Systematic pelvic lymphadenectomy vs no lymphadenectomy in early-stage endometrial carcinoma: randomized clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101:897-8.
56. Benedetti Panici P, Basile S, Maneschi F, et al. Systematic pelvic lymphadenectomy vs no lymphadenectomy in early-stage endometrial carcinoma: randomized clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100:1707-16.
57. Todo Y, Kato H, Kaneuchi M, Watari H, Takeda M, Sakuragi N. Survival effect of para-aortic lymphadenectomy in endometrial cancer (SEPAL study): a retrospective cohort analysis. *Lancet.* 2010;375:1165-72.

58. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 89–95.
59. Salvesen HB, Haldorsen IS, Trovik J. Markers for individualised therapy in endometrial carcinoma. *Lancet Oncol*. 2012;13:e353-61.
60. Engelsen IB, Stefansson IM, Akslen LA, Salvesen HB. GATA3 expression in estrogen receptor alpha-negative endometrial carcinomas identifies aggressive tumors with high proliferation and poor patient survival. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199: 543–47.
61. Creasman WT. Prognostic significance of hormone receptors in endometrial cancer. *Cancer* 1993; 71 (suppl): 1467–70.
62. Singh M, Zaino RJ, Filiaci VJ, Leslie KK. Relationship of estrogen and progesterone receptors to clinical outcome in metastatic endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* 2007; 106: 325–33.
63. Kauppila AJ, Isotalo HE, Kivinen ST, Vihko RK. Prediction of clinical outcome with estrogen and progestin receptor concentrations and their relationships to clinical and histopathological variables in endometrial cancer. *Cancer Res* 1986; 46: 5380–84.
64. Pradhan M, Abeler VM, Danielsen HE, et al. Prognostic importance of DNA ploidy and DNA index in stage I and II endometrioid adenocarcinoma of the endometrium. *Ann Oncol* 2012; 23: 1178–84.
65. Iversen OE. Flow cytometric deoxyribonucleic acid index: a prognostic factor in endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 155: 770–76.
66. Susini T, Amunni G, Molino C, et al. Ten-year results of a prospective study on the prognostic role of ploidy in endometrial carcinoma: dNA aneuploidy

- identifies high-risk cases among the so-called 'low-risk' patients with well and moderately differentiated tumors. *Cancer* 2007; 109: 882–90.
67. Engelsen IB, Stefansson IM, Beroukhim R, et al. HER-2/neu expression is associated with high tumor cell proliferation and aggressive phenotype in a population based patient series of endometrial carcinomas. *Int J Oncol* 2008; 32: 307–16.
68. Stefansson IM, Salvesen HB, Immervoll H, Akslen LA. Prognostic impact of histological grade and vascular invasion compared with tumour cell proliferation in endometrial carcinoma of endometrioid type. *Histopathology* 2004; 44: 472–79.
69. Salvesen HB, Iversen OE, Akslen LA. Prognostic significance of angiogenesis and Ki-67, p53, and p21 expression: a population- based endometrial carcinoma study. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1382–90.
70. Risinger JI, Hayes K, Maxwell GL, et al. PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 3005–10.
71. Trovik J, Wik E, Stefansson IM, et al, and the MoMaTec Study Group. Stathmin overexpression identifies high-risk patients and lymph node metastasis in endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 3368–77.
72. Salvesen HB, Carter SL, Mannelqvist M, et al. Integrated genomic profiling of endometrial carcinoma associates aggressive tumors with indicators of PI3 kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 4834–39.
73. Saal LH, Johansson P, Holm K, et al. Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 7564–69.
74. Weisel JW. Fibrinogen and fibrin. *Adv Protein Chem.* 2005;70:247-299.

75. Tennent GA, Brennan SO, Stangou AJ, O'Grady J, Hawkins PN, Pepys MB. Human plasma fibrinogen is synthesized in the liver. *Blood*. 2007;109:1971-4.
76. Costantini V, Zacharski LR, Memoli VA, Kisiel W, Kudryk BJ, Rousseau SM. Fibrinogen deposition without thrombin generation in primary human breast cancer tissue. *Cancer Res* 1991;51:349–53.
77. Bárdos H, Molnár P, Csécsei G, Adány R. Fibrin deposition in primary and metastatic human brain tumours. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996;7:536–48.
78. Bárdos H, Juhász A, Répássy G, Adány R. Fibrin deposition in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx. *Thromb Haemost* 1998;80:767–72.
79. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986;315:1650–9.
80. Lee SY, Lee KP, Lim JW. Identification and biosynthesis of fibrinogen in human uterine cervix carcinoma cells. *Thromb Haemost* 1996;75:466–70.
81. Molmenti EP, Ziambaras T, Perlmutter DH. Evidence for an acute phase response in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 1993;268:14116–24.
82. Palumbo JS, Kombrinck KW, Drew AF, Grimes TS, Kiser JS, Degen JL, et al. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells. *Blood* 2000;96:3302–9.
83. Camerer E, Qazi AA, Duong DN, Cornelissen I, Advincula R, Coughlin SR. Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. *Blood* 2004;104:397–401.
84. Simpson-Haidaris PJ, Rybarczyk B. Tumors and fibrinogen. The role of fibrinogen as an extracellular matrix protein. *Ann NY Acad Sci* 2001;936:406–25.

85. Polterauer S, Seebacher V, Hefler-Frischmuth K, Grimm C, Heinze G, Tempfer C, et al. Fibrinogen plasma levels are an independent prognostic parameter in patients with cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200:647.e1–7.
86. Ma Y, Qian Y, Lv W. The correlation between plasma fibrinogen levels and clinical features of patients with ovarian carcinoma. *J Int Med Res* 2007;35:678–84.
87. Polterauer S, Grimm C, Seebacher V, Concin N, Marth C, Tomovski C, et al. Plasma fibrinogen levels and prognosis in patients with ovarian cancer: a multi center study. *Oncologist* 2009;14:979–85.
88. Ghezzi F, Cromi A, Siesto G, Giudici S, Serati M, Formenti G, Franchi M. Prognostic significance of preoperative plasma fibrinogen in endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2010;119:309-13.
89. Seebacher V, Polterauer S, Grimm C, Husslein H, Leipold H, Hefler-Frischmuth K, Tempfer C, Reinthaller A, Hefler L. The prognostic value of plasma fibrinogen levels in patients with endometrial cancer: a multi-centre trial. *Br J Cancer.* 2010;102:952-6.
90. Sahni A, Simpson-Haidaris PJ, Sahni SK, Vaday GG, Francis CW. Fibrinogen synthesized by cancer cells augments the proliferative effect of fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *J Thromb Haemost.* 2008;6:176-83.

## **RINGRAZIAMENTI**

*Il primo grazie è per i miei Maestri, il Professor Pierfrancesco Bolis ed il Professor Fabio Ghezzi: il loro esempio, la loro dedizione, la loro energia, la loro straordinaria capacità professionale ed umana è un riferimento che illumina il mio agire di tutti i giorni, nel lavoro ma anche al di fuori.*

*Grazie a tutti i miei colleghi della Ginecologia ed Ostetricia Divisione A, più grandi e più piccoli, compagni delle mie giornate, ed a tutto il Personale dell'Ospedale F. Del Ponte che ogni giorno garantisce un'assistenza di primissimo livello alle nostre pazienti.*

*Grazie alla Professoressa Cristina Riva, alla Dottoressa Carla Facco ed alla Dottoressa Silvia Uccella, per aver reso possibile questo lavoro: non avrei mai avuto la competenza per eseguire l'analisi immunoistochimica e la successiva elaborazione di quei dati. Grazie anche a tutti i medici, i biologi ed i tecnici della Anatomia Patologica che con il loro lavoro mi hanno aiutato in questa Tesi.*

*Grazie al Dottor Davide Vigetti, al Professor Alberto Passi, alla Dottoressa Sara De Leonibus ed alla Dottoressa Paola Moretto: tantissimo del merito del presente studio va a loro, per la parte dell'analisi molecolare e ancor di più per la vicinanza e la collaborazione nei momenti in cui non riuscivo ad interpretare questi risultati.*

*Grazie a Francesca, compagna dei miei giorni, delle mie notti: dal Luglio 2007 ogni traguardo che sono stato capace di raggiungere è suo e non ci sarebbe senza di lei.*

*Grazie ad Alessandro, che con il suo solo esistere è capace di dare senso ai miei giorni.*

*Grazie a Romania, Silvia, Laura e Sara, ognuna per motivi diversi ma tutte egualmente importanti: appiglio sicuro in qualunque circostanza ed esempio nella mia esistenza.*

*Grazie ad Alberto, Daniele, Federico, Leonardo, Leda Sofia.*

*Grazie a Nicola, Lorenzo, Gabriele, Giacomo, Pietro, Matteo, Romina.*