

# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

Facoltà di Medicina e Chirurgia  
Corso di Laurea Specialistica in Medicina e Chirurgia  
Dipartimento Universitario di Scienze Medico-Diagnostiche e Terapie  
Speciali

Tesi di Laurea

## **VALUTAZIONE DELL' ENDOTHELIN AXIS (ET-1, ET<sub>A</sub>R, ET<sub>B</sub>R) COME MARKERS PROGNOSTICI PER IL CARCINOMA INVASIVO DELLA VULVA MEDIANTE TECNICA IMMUNOISTOCHEMICA SU MICROARRAY TISSUTALE**

**Relatore: Ch.mo Prof. PAOLA ARSLAN**

**Correlatori: Ch.mo Univ-Prof. Dr. RALPH J. LELLÉ, MIAC**

**Ch.mo Prof. TIZIANO MAGGINO**

**OÄ Dr. med. ELKE ELTZE**

**Laureando: MATTEO BERTOLIN**

**Anno Accademico 2004-2005**



Tesi svolta presso:

L' Università di Münster (Germania):

**Westfälische Wilhelms-Universität Münster**

Ospedale Universitario:

**Universitätsklinikum Münster.**

Dipartimenti:

**Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und  
Geburtshilfe**

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ludwig Kiesel

Albert-Schweitzer-Straße 33  
48149 Münster

**Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie**

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Böcker

Domagkstraße 17  
48149 Münster



*A mia Madre, una donna forte*  
*A mio Padre che sempre su di me dall'alto vigilia*  
*Alla mia Famiglia per il continuo supporto senza il quale*  
*nulla sarebbe stato possibile*  
*A Maria Verena per tutti i momenti*



## SOMMARIO

**Introduzione:** Il carcinoma della vulva è un raro tumore ginecologico (incidenza pari al 3-5% di tutte le neoplasie dell'apparato genitale femminile) che colpisce prevalentemente donne in età avanzata. Il carcinoma squamo-cellulare è il tipo istologico più frequente (90-95%). I fattori prognostici più importanti sono il TNM staging, la profondità di invasione e la presenza di metastasi linfonodali. La chirurgia rappresenta il trattamento standard per la maggioranza dei carcinomi primari della vulva, seguita, quando necessario, da sedute di radioterapia. Un'alta percentuale di pazienti sviluppa una o più recidive dopo il trattamento chirurgico primario, e per questo deve essere programmato un follow-up di routine.

**Obiettivi:** L' endothelin axis (Endotelina 1 e suoi recettori ET<sub>A</sub>R ed ET<sub>B</sub>R) sono iperespressi in vari tipi di neoplasie. Noi abbiamo analizzato l' espressione dell' ET axis nel carcinoma della vulva ed il suo valore prognostico.

**Metodi:** Campioni di tessuto sono stati ricavati da 68 pazienti sottoposte a trattamento chirurgico di asportazione locale o di vulvectomia radiale. L'espressione dell'ET axis è stata determinata mediante tecnica immunohistochimica su microarray tissutale.

**Risultati:** Elevati livelli di colorazione per ET-1 sono correlati molto significativamente con stadi precoci del tumore (pT1-T2) ( $P=0,004$ ) e con la presenza di metastasi ( $P=0,04$ ). Alti livelli di espressione di colorazione di ET<sub>B</sub>R sono in relazione significativa con la ripresa evolutiva della malattia ( $P=0,01$ ), una diminuzione dell'intervallo libero da malattia ( $P=0,019$ ), con lo sviluppo di metastasi ( $P=0,09$  un trend) e con il coinvolgimento linfonodale ( $P=0,059$  un trend). Una riduzione significativa della sopravvivenza totale è dimostrata per quanto riguarda i pazienti con stadi precoci (pT1-T2) (log rank  $P=0,036$ ), nei pazienti senza radioterapia (log rank  $P=0,0539$ ) e nei casi con pM1 (log rank  $P=0,0019$ ). Inoltre nei casi con tumore agli stadi precoci (pT1-T2) una riduzione dell'intervallo libero da malattia è in relazione con alte espressioni di ET<sub>B</sub>R (long rank  $P=0,0206$ ). Esiste una correlazione significativa tra entrambi i recettori con la ripresa evolutiva della malattia ( $P=0,022$ ) e con lo sviluppo di recidive locali ( $P=0,005$ ).

**Conclusioni:** Questi risultati suggeriscono che in aggiunta agli usuali fattori di rischio ed ai criteri di classificazione TNM, la misurazione dell'espressione dell' endothelin axis mediante analisi immunohistochimica può essere usata in futuro nel predire la prognosi delle pazienti con carcinoma squamo-cellulare invasivo della vulva.



## ABSTRACT

**Background:** Vulvar carcinoma is a rare gynecologic malignancy (incidence rate 3-5% of all female genital tract neoplasias) and mainly affects elderly women. Squamous cell carcinoma represent the vast majority of vulvar carcinomas (90-95%). TNM staging, deep of stromal invasion and presence of lymph node metastasis are the most important prognostic factors. Surgery is the standard treatment for primary vulvar carcinoma, followed by post operative radiotherapy when is necessary. After primary treatment a high rate of patients develop recurrences, and a routine follow-up is necessary.

**Purpose:** The ET-axis (Endothelin-1 and its receptors ET<sub>A</sub>R and ET<sub>B</sub>R) is overexpressed in various human tumors. We analyzed the ET-axis expression in vulva cancer, and its prognostic value.

**Methods:** Samples were obtained from local excision and radical vulvectomy patients. ET-axis expression was investigated immunohistochemistry on tissue microarrays of 68 vulva cancer patients.

**Results:** Elevated ET-1 expression of tumour cells is correlated high significantly to early stages pT1-T2 (P=0,004), and presence of metastasis (P=0,04). High staining levels ET<sub>B</sub>R within tumour

tissue was related significantly to tumour progression ( $P=0,01$ ), relapse-free survival ( $P=0,019$ ), delayed metastasis ( $P=0,09$  as a trend) and lymph node involvement ( $P=0,059$  as a trend). A significant reduced overall survival could be shown concerning the low stages (pT1-2) (log rank  $P=0,036$ ) and the patients without radiotherapy (log rank  $P=0,0539$ ) as well as for the pM1 stage (log rank  $P=0,0019$ ). A significant reduced disease free survival could be shown concerning the low stages (pT1-T2) (log rank  $P=0,0206$ ) with high ET<sub>B</sub>R expression. A correlation of both receptors was related significantly with tumour progression ( $P=0,022$ ) and with local recurrence ( $P=0,005$ ).

**Conclusions:** These results suggest that, in addition to known histological risk factors and TNM classification criteria, measurement of ET-R expression with a simple immunohistochemical analysis might further help in predicting the prognosis of patients with vulva squamous cell carcinoma.



## **INDICE GENERALE**

<b>1 Introduzione</b> _____	<b>1</b>
Epidemiologia _____	1
Eziologia e fattori di rischio _____	4
Cenni anatomici _____	8
Istopatologia _____	11
Preneoplasie _____	11
Carcinoma squamocellulare invasivo (ISCC) _____	16
Biologia Molecolare del Carcinoma vulvare _____	19
Stadiazione _____	25
Clinica _____	29
Sintomi e diagnosi _____	29
Tecniche di diagnostica per immagini _____	33
Fattori Prognostici _____	36
Dimensioni del tumore _____	37
Profondità di invasione _____	37
Invasione dei linfonodi _____	41
Mappatura linfatica _____	45
Terapia _____	50
Terapia delle lesioni allo stadio iniziale _____	52
Terapia delle lesioni con stadio avanzato _____	55
Complicanze post operatorie _____	58
Radioterapia e chemioterapia _____	60
Le recidive _____	63
Il follow-up _____	64
<b>2 Obiettivi dello studio</b> _____	<b>67</b>

<b>3 Materiali e Metodi</b>	<b>77</b>
Reclutamento dei casi e raccolta dei dati clinici e di follow-up	78
Ricerca e valutazione del materiale patologico	79
Costruzione del tissue microarray (TMA)	81
Analisi immunoistochimica	82
Analisi statistica	85
<b>4 Risultati</b>	<b>89</b>
Valutazione dei dati clinici	89
Valutazione dei risultati immunoistochimici	96
Correlazioni statistiche	98
Associazioni con la sopravvivenza	110
Analisi delle correlazioni con Ki-67 e tra le diverse endoteline	117
<b>5 Discussione</b>	<b>119</b>
Popolazione in relazione alla letteratura	119
Analisi dell'espressione dell' ET axis con le variabili clinico- patologiche	120
Confronto con gli studi riportati in letteratura	124
Applicazioni cliniche	125
<b>6 Conclusione</b>	<b>129</b>
<b>7 Riferimenti bibliografici</b>	<b>131</b>



## **1 INTRODUZIONE**

Le neoplasie della vulva sono una rara patologia maligna, rappresentano circa il 5% di tutte le neoplasie ginecologiche, e meno dell' 1% di tutte le neoplasie della donna.

Il carcinoma invasivo squamo-cellulare dell'epitelio piatto (ISCC) costituisce il tipo istologico più frequente con circa il 90% dei tumori primari della vulva. Vi sono però una notevole varietà di altre neoplasie vulvari, che comprendono il melanoma vulvare (5%), adenocarcinoma (a partenza dalla ghiandola del Bartholini), i tumori di origine mesenchimale, il carcinoma neuroendocrino ed il sarcoma vulvare<sup>1,2,3</sup>. Raramente la regione vulvare può essere sede di metastasi da parte di altri tumori ginecologici, come l' adenocarcinoma dell' endometrio, il carcinoma dell' ovaio e della cervice, inoltre può essere sede di sviluppo di metastasi ab continuo da parte del carcinoma dell'ano e della vescica, e sede di metastasi a distanza di tumori come il carcinoma della mammella, del polmone, micosi fungoide e linfomi<sup>4</sup>.

## **EPIDEMIOLOGIA**

I tumori maligni della regione vulvare rappresentano il 5% circa di tutte le neoplasie maligne a carico degli organi genitali femminili. Nei paesi industrializzati sono la quarta neoplasia ginecologica, dopo i tumori dell' endometrio, dell'ovaio e della cervice. Il rapporto

annuale di previsione statistica dell'American Cancer Society, ha stimato in 3870 nuovi casi ed in 870 i decessi per carcinoma vulvare per l'anno 2005 negli USA<sup>5</sup>. Mentre in Gran Bretagna sono stati stimati circa 1000 nuovi casi per anno<sup>6</sup>, contro i 1350 della Germania<sup>7</sup>. Uno studio geografico dettagliato sull'incidenza e la mortalità del carcinoma vulvare è difficile da effettuare sia per la rarità della neoplasia, sia perché normalmente questa neoplasia viene raggruppata con il carcinoma della vagina, il carcinoma delle tube di fallopia ed altri tumori dell'apparato genitale femminile.

L'incidenza maggiore, con circa 4 casi ogni 100000 donne, è riportata nei paesi in via di sviluppo come la Polinesia, l'Argentina, il Brasile ed il Perù, mentre per i paesi europei, il valore medio si attesta su 3,5/100000 donne (Germania ed Italia), contro un 2,2 per gli USA ed una incidenza ancora minore per le donne del Giappone, Cina, Corea ed asiatiche americane.<sup>8</sup>

Come riportato nella letteratura corrente, questa patologia è tipica dell'età avanzata, con un picco di incidenza tra la settima e la ottava decade di vita. All'incirca il 65% dei casi sono diagnosticati oltre i 65 anni d'età mentre circa il 15% dei casi con età inferiori ai 40 anni. Nonostante l'incidenza del carcinoma vulvare nelle donne anziane sia rimasta relativamente stabile nelle ultime decadi, non si può non notare come negli ultimi anni vi sia un'incremento dell'incidenza nelle donne più giovani, al di sotto dei 55 anni<sup>9,10</sup>, un trend globale riscontrato dagli studi epidemiologici svolti in USA,



Gran Bretagna, Scandinavia, Nuova Zelanda, Austria e Svizzera.<sup>11</sup>(251-256). Per esempio dai dati inglesi, risulta che dal 1979 al 1999, la percentuale delle pazienti al di sotto dei 50 anni, sia passata da un 6% ad un 12%, ovvero raddoppiata<sup>12</sup>. Naturalmente i casi di pazienti con un'età al di sotto dei 35 anni, restano ancora limitati, anche se l'età di insorgenza si può spingere fino alle soglie della pubertà (è stato riportato un caso di una paziente di soli 13 anni<sup>13,7</sup>).

Quello che si nota invece è il deciso incremento della frequenza delle neoplasie intraepiteliali vulvari *in situ* (VIN), ovvero quello spettro di cambiamenti intraepiteliali che vanno dalla displasia lieve (VIN I), moderata (VIN II) alla severa (VIN III), che solitamente precedono il carcinoma vulvare. Negli ultimi 25 anni l'incidenza di VIN è più che raddoppiata nei paesi industrializzati, soprattutto nelle giovani donne<sup>14</sup>. I dati americani, riportano un incremento stimato annuo del 2,4%, per gli anni 1992-1998<sup>15</sup>.

La mortalità per carcinoma della vulva è circa 0.5/100000 donne per gli Usa<sup>16</sup> e 1,3/100000 donne per la Germania<sup>6</sup> un valore non molto elevato. Il trend della mortalità, ha avuto un picco di incidenza tra gli anni 1975-1985, per poi stabilizzarsi sui valori attuali. La sopravvivenza a cinque anni dalla diagnosi è del 68%, che però decresce con l'aumentare dell'età delle pazienti, di una diagnosi tardiva, dallo stadio del tumore (TNM) e dallo stato dei linfonodi.

## **EZIOLOGIA e FATTORI DI RISCHIO**

L'eziologia del carcinoma della vulva, rimane tutt'oggi poco chiara ed non è ancora stato individuato un fattore eziologico specifico ed univoco.

I risultati dei primi studi condotti tra la fine degli anni '80 ed i primi anni '90, (Sherman e Darling) evidenziavano come il carcinoma della vulva avesse dei fattori di rischio equiparabili a quelli del carcinoma della cervice, tra cui il fumo, il numero di partners sessuali, uso di contraccettivi orali, stati di immunodepressione, fattori dietetici e pregressa storia di esami citologici alterati<sup>17,18,19,20</sup>. Questi dati sono stati rilevati prima dello sviluppo di un test per HPV (human papilloma virus). Il ruolo giocato dall'HPV, rimane discordante. La letteratura precedente agli anni '90, ha sempre parlato del carcinoma invasivo delle cellule squamose della vulva, come di un' unica entità, ed ad essa ha associato o meno il ruolo eziologico dell' HPV. Nell' eziologia del carcinoma della vulva il ruolo dell' HPV rimane controverso, poiché se è vero che spesso sono stati associati i medesimi fattori di rischio per il carcinoma della cervice, tra cui la positività per HPV è il principale (positività riscontrata in circa il 90% dei casi), nel carcinoma vulvare la positività per l' HPV oscilla tra il 20% ed il 50% casi<sup>21</sup>.

Oggi la teoria maggiormente accettata risulta essere quella proposta da Kurman *et al.* <sup>22</sup>, secondo la quale un' analisi sull'

influenza che può avere l'HPV sullo sviluppo del carcinoma della vulva, non può essere fatta se prima non si esegue un'ulteriore suddivisione dei vari carcinomi della vulva, basata sulle osservazioni epidemiologiche e clinicopatologiche.

Dai casi dapprima riportati da Lewers *et al.* e poi da un'accurata descrizione fatta da Andersen *et al.*(1991), si suggerisce l'esistenza di due distinte entità clinico-patologiche<sup>12,22</sup>: la prima che rappresenta la maggioranza dei tumori vulvari, tipicamente presente nelle donne anziane (dai 65 agli 85 anni), caratterizzata da distrofia epiteliale e dalla presenza di una componente infiammatoria, non associata ad HPV ed ad altri cofattori; la seconda invece, rappresenta la minoranza dei tumori vulvari, è tipica delle donne più giovani (dai 35 ai 65 anni), associata ad una concomitante presenza di VIN, fortemente correlata ad una positività per l'HPV e nella quale i cofattori eziologici, come fumo di sigaretta ed abitudini sessuali, hanno un ruolo importante. Queste osservazioni furono poi confermate e teorizzate dalle successive analisi di Kurman *et al.*(1993)<sup>23</sup>, in cui si esaminarono i cambiamenti epiteliali adiacenti ad un carcinoma, e si evidenziò come un terzo delle pazienti presentasse una concomitante VIN di tipo indifferenziato, mentre nei rimanenti 2/3 vi erano ipertrofie tipiche od atipiche, distrofie, lichen sclerosus oppure una combinazione di questi associati alla presenza di VIN ben differenziato.

Questi due tipi di tumore sono ora distinti istologicamente in:

- tumore vulvare di tipo cheratinizzante, tipico delle anziane, spesso associato ad una storia di lichen sclerosi o di altre squamodermatosi vulvari, non correlato con l' HPV e con la presenza concomitante di VIN.
- tumore vulvare di tipo basaloide ed uno di tipo condilomatoso (warty carcinoma), tipici delle pazienti più giovani, entrambi con una forte correlazione con l'HPV tipo 16, e con la presenza di adiacenti VIN di grado elevato<sup>3,12</sup>. Inoltre i carcinomi di tipo basaloide, sono spesso associati con lo sviluppo di un carcinoma vaginale o della cervice<sup>3</sup>. In questi tumori, alcuni cofattori eziologici, come malattie sessualmente trasmesse oppure il fumo, sono più frequentemente determinati.

Dopo l' introduzione di questa nuova classificazione istologica dei tumori vulvari, Trimble *et al* rianalizzarono i dati di un precedente studio caso-controllo<sup>24</sup>, confermando appieno i due differenti modelli e meccanismi patogenetici sopramenzionati<sup>25</sup>.

La presenza di una positività all' HPV, non deve essere considerata una causa necessaria per lo sviluppo di un carcinoma vulvare, come avviene per il carcinoma della cervice, proprio per la sua stretta associazione con una sola specifica tipologia di tumore della vulva<sup>26</sup>. Vari studi epidemiologici ed osservazioni clinicopatologiche sono state fatte per i diversi tipi di HPV DNA; il sottotipo sierologico più studiato e significativo è risultato essere il HPV-16. Questi

studi hanno dimostrato che le pazienti con anticorpi positivi anti HPV-16, hanno un rischio relativo maggiore di sviluppare un carcinoma invasivo della vulva di tipo basaliode, rispetto alle pazienti con anticorpi anti HPV-16 negativi (OR= 4,5 per HPV-16 pos., contro OR= 2,9 per HPV-16 neg )<sup>27</sup>. Risultati meno importanti sono stati rilevati per la sieropositività a HPV-18 ed a HPV-33<sup>26,28,28</sup>.

Una nuova e promettente possibilità terapeutica contro le infezioni da HPV è offerta dallo sviluppo di nuovi vaccini anti HPV. Vi sono sostanzialmente due tipi di vaccini: terapeutici, che inducono una immunità cellulare contro le cellule epiteliali infette dall'HPV, e vaccini profilattici, che inducono la produzione di anticorpi anti HPV contro le nuove infezioni, ma che non sono efficaci nelle infezioni in atto. I pochi dati al momento disponibili in letteratura, data la brevità dei follow-up, sembrano indicare una notevole efficacia dei vaccini profilattici, ed un decremento, in prospettiva, dei tumori HPV correlati, primo tra tutti il carcinoma della cervice<sup>29</sup>.

Altri cofattori, come il fumo, sieropositività per herpes simplex virus (HSV-2), e numero di partners sessuali, sono stati al centro di vari studi eziologici.

Il fumo, in particolare, oltre ad aumentare il rischio di 3 volte di sviluppare un carcinoma vulvare infiltrante rispetto a pazienti non fumatrici, sembra avere un' importante interazione con la

sieropositività per HPV-16. Restrungendo l'analisi ai soli soggetti HPV-16 sieropositivi e fumatori, è stato osservato un' aumento del rischio relativo che varia da un minimo di 8,5 volte (Hildsheim *et al*)<sup>30</sup> ad un massimo di 18,8 ( Medeleine *et al* )<sup>26</sup>, rispetto alle pazienti non fumatrici HPV-16 sieropositive che hanno rischio aumentato 2,9 e 3,4 volte. Questi dati suggeriscono un ruolo del fumo come cofattore per lo sviluppo di un carcinoma vulvare.

Anche uno stato immunocompromesso sembra essere un fattore predisponente ed accelerante lo sviluppo di una neoplasia in questa regione. Una teoria sembra essere quella di una inefficace distruzione delle cellule HPV infette<sup>31</sup>. Inoltre in una paziente immunocompromessa sembra essere accelerato sia lo sviluppo della neoplasia vulvare da una primaria lesione neoplastica, che la recidiva dopo trattamento rispetto ad una immunocompetente<sup>32</sup>.

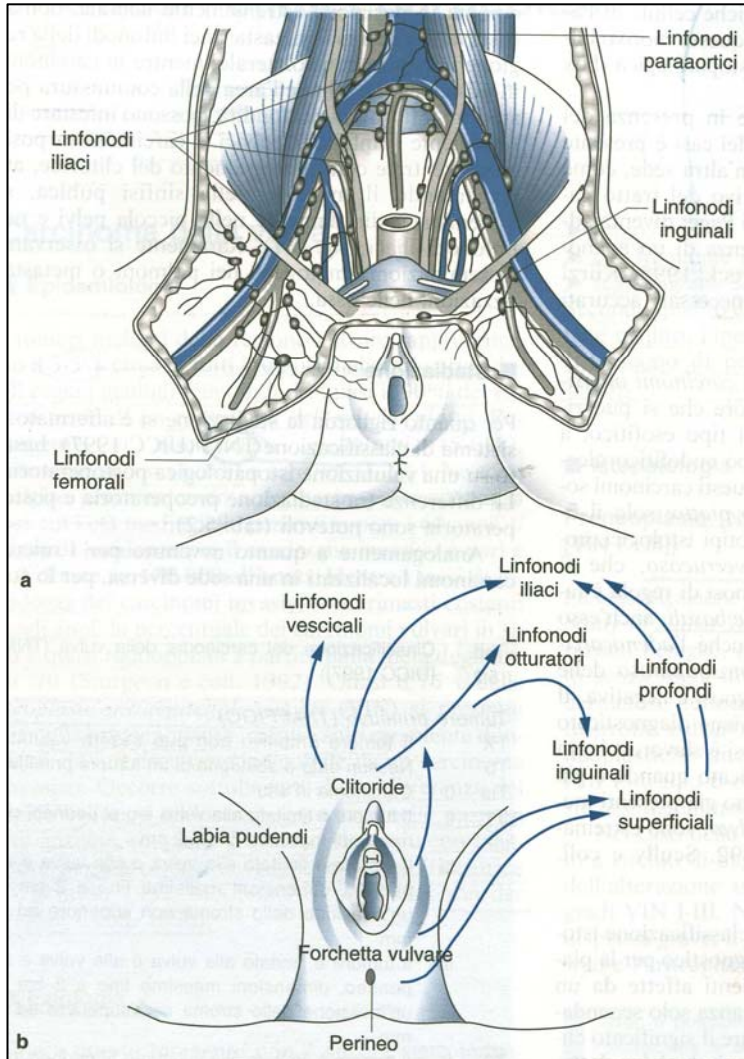
Sono stati proposti anche altri fattori predisponenti, come il diabete, l'obesità e l'ipertensione, l'età avanzata<sup>33</sup>, inoltre l'esposizione a malattie come la sifilide, il linfogranuloma venereo ed il granuloma inguinale <sup>34</sup>.

### **CENNI ANATOMICI**

I genitali esterni femminili, includono il monte del pube, le grandi e piccole labbra, il clitoride, il bulbo del vestibolo, le ghiandole del vestibolo (comprendenti le ghiandole del Bartolini) ed il vestibolo della vagina. Assieme queste strutture formano la vulva. La regione

compresa tra la commissura posteriore delle labbra e l'ano, viene chiamata perineo.

La vulva confina posteriormente con la vagina, inferiormente con la regione anale e rettale, lateralmente è contenuta dai rami ischio-



**Figura 1:** Vie di drenaggio linfatico della regione vulvare

fitta rete di vasi linfatici anastomizzati tra loro (figura 1). I linfonodi inguinali sono tributari della regione delle piccole e grandi labbra. Questi si dividono in linfonodi inguinali superficiali e profondi, messi in relazione tra loro; i primi si trovano nel tessuto sottocutaneo del triangolo femorale, tra la fascia adiposa del

pubici, e dal pavimento muscolare pelvico, superiormente con la sinfisi pubica e superiormente confina con la vescica e contrae rapporti con l'uretra.

La regione vulvare è drenata da una

Camper e la fascia lata, vicino allo sbocco della vena grande safena nella vena femorale; i secondi si trovano all'interno del triangolo femorale, sotto la fascia lata, situati lungo i tronchi linfatici profondi che decorrono lungo i vasi femorali. La regione clitoridea è drenata anche dai linfonodi iliaci interni ed otturatori, ed in parte anche dai linfonodi vescicali. La parte perineale è drenata oltre che dai linfonodi inguinali ed iliaci, anche dai linfonodi pelvici<sup>2,35</sup>. I linfonodi inguinali superficiali drenano nei linfonodi inguinali profondi (femorali) i quali a loro volta scaricano nei linfonodi della parete pelvica.

Questa precisazione anatomica è necessaria per comprendere la propagazione del tumore vulvare e le vie di diffusione delle metastasi linfonodali.

Approssimativamente circa il 60-70% dei carcinomi squamosi, coinvolgono le piccole e grandi labbra, mentre un 15-20% dei casi interessano l'area clitoridea ed una percentuale analoga per la zona perineale. Vi sono inoltre casi che presentano lesioni multifocali o che giungono all'osservazione con delle lesioni così estese che non è possibile determinare il sito di origine <sup>2</sup>.



## ISTOPATOLOGIA

### **Preneoplasie**

Tradizionalmente, nel passato, le distrofie come il lichen sclerosus, l'iperplasia squamosa e le altre dermatosi, erano considerate le vere lesioni preneoplastiche della vulva, per la loro frequente associazione con il carcinoma vulvare. Successivamente studi prospettici, eseguiti prevalentemente negli anni '70, hanno evidenziato come i vari processi distrofici vulvari, avessero una scarsa propensione allo sviluppo della neoplasia. Ciò rendeva necessaria una nuova classificazione delle distrofie che liberasse dalle diverse proposte classificative del passato, basate sulla sola apparenza macroscopica, inattendibile per la predittività della lesione istologica (leucoplachia, eritroplasia, craurosi, dermatosi sclerotica etc). Nel 1989 l' *International Society for the Study of Vulvo-Vaginal Disease* (ISSVD) in accordo con l'*International Society of Gynaecological Pathologist* (ISGP), propose una nuova classificazione delle alterazioni come l'iperplasia squamosa (detta anche distrofia ipertrofica dell'epitelio piatto senza segni di atipia), il lichen sclerosus e le altre dermatosi vulvari, definendole come "alterazioni epiteliali vulvari non neoplastiche". Il potenziale maligno di queste alterazioni non neoplastiche è molto limitato, sembra che solamente il 4% dei lichen sclerosus possa sviluppare un carcinoma invasivo<sup>2,36</sup>. Tra queste rientrano anche i condilomi acuminati con HPV di tipo 6 e 11, anche se una piccola

percentuale (7%) può evolvere da condiloma benigno a carcinoma per la presenza di una componente sovrainfetta con HPV-DNA 16<sup>37</sup>.

Nel caso di neoplasia intraepiteliale vulvare (VIN) si tratta di alterazioni epiteliali caratterizzate dalla presenza di cheratinociti atipici, con un rischio di degenerazione e sviluppo della neoplasia. A seconda dell'entità dell' alterazione isto-morfologica di tipo squamoso, si distinguono i vari gradi di displasia (tabella I):

**Tabella I:** Lesioni intepiteliali squamose della vulva

	<b>Classificazione delle lesioni intraepiteliali squamose della vulva</b>
<b>VIN 1</b>	Displasia lieve, confinata nel terzo inferiore dello strato epiteliale
<b>VIN 2</b>	Displasia moderata, che coinvolge i 2/3 inferiori dell'epitelio
<b>VIN 3</b>	Displasia severa, estesa anche al terzo superiore dell'epitelio, ma che non coinvolge tutto lo strato epiteliale
<b>Carcinoma in situ</b>	lesione squamosa intraepiteliale nella quale le anormalità nucleari coinvolgono tutto lo strato epiteliale, o nella quale la porzione inferiore dell'epitelio sia sostituita da una lesione assomigliante al grado 1 del carcinoma vulvare a cellule squamose

Ultimamente le VIN hanno acquisito sempre più importanza

proprio per il progressivo incremento dell'incidenza delle VIN, più che raddoppiato nelle ultime due decadi.

Si distinguono attualmente due diversi tipi di VIN; uno chiamato VIN classico, o di tipo Bowenoido, strettamente associato all'infezione da HPV, (comprendenti le forme basalioidi, condilomatose e miste della vecchia classificazione) e ed un altro, chiamato VIN differenziato o semplice, non associato con infezioni virali.

Il tipo maggiormente studiato per la maggior frequenza e per il rapido aumento dell'incidenza in questi ultimi anni, è il VIN classico. Esso è più frequente nelle giovani donne (dai 30 ai 40 anni), sessualmente attive, fumatrici (dal 60 all'80% delle pazienti sono fumatrici), con storie di condilomi, infezioni da herpes genitale, malattie sessualmente trasmesse e stati di immunodeficienza. Clinicamente può presentarsi con una varietà di fenotipi, come la tipica lesione rigonfiata, di colore biancastro, oppure lesioni caratterizzate da regioni ispessite, dure e pigmentate, od ancora come lesioni ricoperte da placche eritematose, o masse con aspetto verrucoso, polipoide od a papula. La superficie di queste lesioni può essere ruvida o liscia. Spesso il VIN classico ha una distribuzione multicentrica, e possono esservi delle concomitanti alterazioni da patologia preinvasiva da HPV a livello della vagina (VAIN) e della cervice (CIN).

Il VIN differenziato o cheratinizzante, è meno frequente e più

difficile da diagnosticare. Tipico delle donne in post-menopausa, non è associato ad HPV e la frequenza delle pazienti fumatrici si attesta attorno al 25%. Clinicamente si presenta come un lesione unifocale scarsamente aumentata di volume, non ben definita, con delle regioni indurite, di superficie irregolare e solitamente presenta una colorazione bianco-grigiastra. Nelle vicinanze vi possono essere delle dermatosi, tipicamente il lichen scleroso. Istologicamente può essere facilmente confusa con una iperplasia squamosa, tanto che può essere necessaria una determinazione immunoistochimica del p53 <sup>38,39</sup>.

La distinzione in questi due tipi, classico e differenziato, è importante poiché il loro sviluppo e la loro prognosi differisce dopo il trattamento.

In vari studi condotti sul VIN classico, dal 3 al 10% delle pazienti trattate sviluppano successivamente un SCC<sup>40</sup>, soprattutto se fumatrici, con età maggiore di 40 anni ed uno stato di immunodeficienza; mentre per le pazienti più giovani, con lesioni multiple, piccole e pigmentate, la frequenza di regressione spontanea dopo trattamento risulta essere più alta <sup>41</sup>.

Dati certi sulla evoluzione del VIN a carcinoma invasivo, non sono facilmente ricavabili dalla letteratura, sia per la differenza nel trattamento che per la difficoltà del follow-up. In vari studi (Herold *et al* <sup>42</sup>; Jones *et al* <sup>39</sup>) sono state analizzate le lesioni VIN 3 più gravi, associate ad HPV-DNA 16; esse presentano indici di

progressione dell'ordine del 70-90% in tempi compresi tra i 2 e i 3 anni. Invece in uno studio di Yang e Hart è il VIN 3 di tipo differenziato, che sembra avere un maggior potenziale di evolvere verso un ISCC invasivo, dove il 58% delle pazienti trattate per VIN 3 avevano un SCC sottostante o lo hanno sviluppato successivamente <sup>38</sup>.

Oltre alle neoplasie intraepiteliali vulvari, non possiamo non citare anche le patologie intraepiteliali di origine non squamosa, come il Morbo di Paget ed il melanoma in situ che sono le più frequenti. Un breve approfondimento merita il Morbo di Paget della vulva per la variabilità del significato clinico-prognostico.

Il Morbus Paget si presenta come una lesione eritematosa o eczematosa, umida, con aree bianche ipercheratosiche, che coinvolge il vestibolo e le zone adiacenti e che causa un prurito e dolore localizzato. Recentemente il Morbo di Paget è stato subclassificato in 3 tipi, in base alle diverse origine delle cellule neoplastiche.

- Tipo 1: malattia cutanea di Paget primaria della vulva, a sua volta classificata in stadio 1a, caratterizzato da una proliferazione intraepiteliale di cellule ghiandolari atipiche, senza invasione. Può essere considerato come un adenocarcinoma in situ. Lo stadio 1b, è caratterizzato da una invasione nel derma da parte delle cellule di Paget, che può evolvere verso un adenocarcinoma invasivo. L'ultimo stadio, 1c è caratteristico della malattia vulvare di Paget che

presenta le tipiche manifestazioni di sottostante adenocarcinoma primario.

- Tipo 2: malattia di Paget della vulva come segno di manifestazione di un adenocarcinoma primario delle zone adiacenti, come la zona anale, rettale o da altra sede non cutanea (anche a distanza come dal tratto gastrointestinale).
- Tipo 3 : neoplasia intraepiteliale uroteliale con manifestazioni di tipo pagetoide (PUIN), pseudomalattia di Paget e malattia di Paget come manifestazione di una neoplasia uroteliale della vescica<sup>3</sup>.

### **Carcinoma squamocellulare invasivo (ISCC)**

Il termine VIN, come sopraccitato, si riferisce a neoplasie intarepiteliali che comunque non superano la membrana basale e non infiltrano lo stroma. Quando invece ciò avviene, allora si parla di carcinoma invasivo di tipo squamoso.

Istologicamente il carcinoma invasivo si suddivide in 3 tipologie, tutte caratterizzate da una evidente atipia cellulare:

- Il tumore di tipo cheratinizzante: è il tipo istologico più frequente, con circa il 65% dei casi. Tipico delle donne anziane, non associato a VIN ed HPV, e frequentemente circondato da zone di iperplasia e lichen scleroso. Istologicamente è caratterizzato da cellule con un grande pleiomorfismo nucleare, nucleoli prominenti ed abbondante citoplasma; i cheratinociti appaiono atipici ma

maturi e ricchi di cheratina. Tipico è il modo irregolare di infiltrare lo stoma.

- Il tumore di tipo basaloide o condilomatoso: meno frequente del tipo cheratinizzante, si presenta in circa il 25-30% dei casi. Caratteristico delle pazienti più giovani, è associato ad VIN, HPV ed a neoplasie vaginali e cervicali concomitanti. Istologicamente si presenta con cellule piccole di forma ovoidale e relativamente uniformi, con scarso citoplasma ed il nucleo dal caratteristico aspetto “a puntini” determinato dall’abbondanza di granuli di cromatina. Queste cellule ricordano, nella forma, le cellule del carcinoma anaplastico del polmone e del tumore di Merkel. Solitamente è presente un tipico core fibrovascolare.

- Il carcinoma di tipo verrucoso: è il tipo istologico meno frequente con una presentazione di circa il 7% dei casi. Anch’esso associato ad HPV e tipico delle pazienti giovani. Già macroscopicamente si differenzia per l’aspetto esofitico a cavolfiore e per le abbondanti dimensioni; non di rado vi è la presenza di un adiacente condiloma acuminato. Microscopicamente questo tumore si presenta molto ben differenziato, con un alto grado di cellule atipiche vicine allo strato dermico. Istologicamente le cellule sono caratterizzate da un pleiomorfismo nucleare minimo, con una grossolana disposizione della cromatina e nucleoli variabili,

minime sono le mitosi presenti. Il carcinoma verrucoso è caratterizzato da una aggressività locale e da rare metastasi linfonodali. Per questo la sola terapia excisionale risulta essere risolutiva <sup>2,3,43</sup>.

Oltre alla suddivisione istologica, è essenziale stabilire un grading, ai fini della prognosi. La American Joint Committee on Cancer ha proposto questa scala (tabella. II), basandosi sulla percentuale di cellule differenziate presenti.

**Tabella II:** Scala Grading dell' AJCC

	<b>AJCC Grading</b>
<b>GX</b>	Il grado non può essere assegnato
<b>G1</b>	Ben differenziato Non ci sono cellule indifferenziate
<b>G2</b>	Moderatamente differenziato Meno del 50% delle cellule sono indifferenziate
<b>G3</b>	Scarsamente differenziato Più del 50% ma meno del 100% delle cellule sono indifferenziate
<b>G4</b>	Indifferenziato La totalità delle cellule è di tipo indifferenziato

La gravità ed il rischio di recidive è proporzionale all'incremento del grading. Le lesioni ben differenziate sono portate ad estendersi in superficie con invasione minima dei tessuti sottostanti. Le lesioni anaplastiche, invece, sono profondamente invasive .

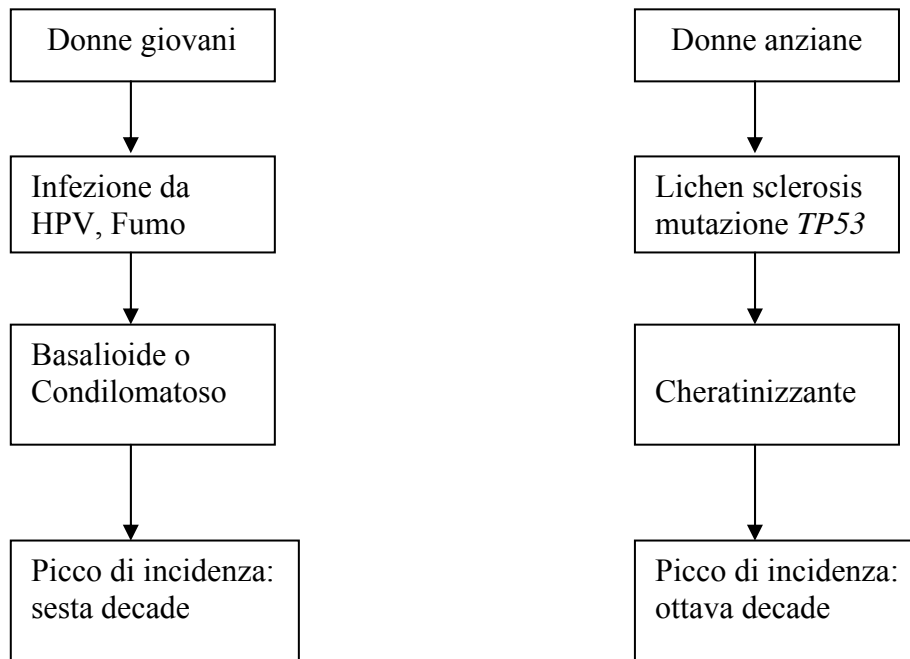
La classificazione istologica quale unico parametro prognostico per



la pianificazione della terapia in pazienti affette da un carcinoma vulvare non è sufficiente. Vanno necessariamente valutati aspetti come l'estensione del tumore, la profondità di infiltrazione nello stroma, capacità di invasione dei vasi linfatici e la presenza di metastasi, ovvero tutte le caratteristiche di sviluppo e di invasione della neoplasia, per poter formulare una prognosi ed una corretta terapia. Da qui la necessità di avere delle scale di staging adeguate.

### **Biologia molecolare del carcinoma vulvare**

Come precedentemente descritto, il carcinoma vulvare può essere suddiviso in due differenti gruppi, sia per ciò che riguarda l'epidemiologia, che per le differenze eziologiche che per le diverse caratteristiche istologiche. Da un punto di vista del meccanismo molecolare, sussiste la stessa suddivisione (figura.2).



**Figura 2** : Differenti tipi di sviluppo del carcinoma vulvare .

Come si vede da questa figura riassuntiva, il tumore cheratinizzante ha una alta frequenza di mutazioni nel gene p53, mentre l'assenza di una HPV-DNA sieropositività sta ad indicare come non vi sia una stretta relazione tra carcinogenesi e HPV per questo tipo istologico.

Nonostante che l' inattivazione funzionale, per mutazione o delezione, dell' oncogene soppressore p53 sia lo stadio universalmente riconosciuto per lo sviluppo e la progressione di un tumore, dati recenti dimostrano come una iperespressione della p53, sia un evento tardivo, e che può essere utilizzato al massimo come marker predittivo per le metastasi linfonodali.

La più frequente alterazione cromosomica nel carcinoma squamoso della vulva è la delezione in 4p13-pter e perdite in 3p ed un'

aumento in 3q. I risultati di uno studio finlandese-coreano, condotto su queste alterazioni cromosomiche, evidenzia come vi sia una stretta somiglianza con le alterazioni cromosomiche del carcinoma della cervice e suggerisce come ci possa essere un background genetico simile tra questi due carcinomi squamosi, e di conseguenza anche una via patogenetica simile<sup>44</sup>.

A prescindere dalle diversità eziologiche, molti studi hanno identificato dei disturbi ed alterazioni nei geni regolatori del ciclo cellulare, nei trasduttori dei segnali cellulari e nei modulatori dell'angiogenesi.

I geni regolatori del ciclo cellulare maggiormente studiati e che hanno dato le maggiori indicazioni nel giocare un ruolo importante nella patogenesi e nello sviluppo del carcinoma vulvare, sono l' RB1 ed il CDKN2A (chiamato anche P16<sup>INK4</sup>) associati con RBL2 e CDKN1B, proteine collegate con lo sviluppo del retinoblastoma. Essi sono dei geni onco-soppressori che codificano per una proteina regolatrice della ciclina D1, una oncoproteina. Un' alterata espressione della ciclina D1 sembra essere associata ad una maggiore profondità di invasione, e in combinazione con una concomitante perdita di espressione da parte di RB1, può rappresentare uno stadio primitivo di trasformazione neoplastica del tessuto vulvare<sup>45,46</sup>. Lo stesso concetto viene confermato se vi è una concomitante perdita di espressione di CDKN2A (o P16<sup>INK4</sup> ), associata con una perdita del gene codificante per la proteina  $\sigma$

(stratifina). La perdita di ambedue questi geni, sembra essere un evento importante e molto precoce nello sviluppo di una neoplasia vulvare. La proteina  $\sigma$  svolge varie funzioni di controllo del ciclo cellulare e di senescenza, nelle cellule epiteliali. Per cui una sua delezione sembra essere un passo necessario per l'immortalizzazione di una linea cellulare<sup>47</sup>. Anche l'analisi del gene oncosoppressore PTEN, sembra dare buoni risultati. Questo gene interviene nei processi di trascrizione, traslazione ed apoptosi e risulta mutato in una grande varietà di neoplasie. Solitamente risulta mutato in tessuti neoplastici provenienti da pazienti con metastasi, ma in uno studio sviluppato da Holway et al, si dimostrava come vi fossero mutazioni anche nel tessuto neoplastico primitivo ed addirittura nelle displasie vulvari, suggerendo come il PTEN possa avere un ruolo precoce nello sviluppo della carcinogenesi vulvare<sup>48</sup>. Con il progredire delle recenti scoperte in campo genetico-molecolare, vi è un incremento in letteratura di ricerche di markers predittivi sullo sviluppo del carcinoma vulvare. Recentemente si è posta attenzione al ruolo della COX-2 nello sviluppo di una neoplasia. Un'iperespressione della COX-2 è associata ad una inibizione dell'apoptosi cellulare ed ad un' aumento della capacità di invasione, di neoangiogenesi e di metastatizzare di una neoplasia. Da uno studio recente sul carcinoma cervicale, l'iperespressione di COX-2 sembra essere un indicatore di aggressività, di non responsività alla terapia

neoadiuvante ed indicatore di una prognosi sfavorevole. Nel carcinoma vulvare, una sovraespressione della COX-2 sembra contribuire alla genesi ed alla progressione tumorale<sup>49</sup>.

La modulazione dell'angiogenesi nel carcinoma vulvare sembra avere un rilevante significato prognostico per individuare tumori aggressivi.

Tra l'espressione dei fattori promuoventi l'angiogenesi, molta importanza ha il ruolo del VEGF (vascular endothelial grow factor). L'espressione del VEGF stimola l'angiogenesi aumentando la permeabilità vascolare ed attivando la proliferazione delle cellule endoteliali. La sua azione nello sviluppo del carcinoma vulvare assume una particolare rilevanza. Oltre ad essere coinvolto nello sviluppo di una nuova rete vascolare indispensabile per la crescita tumorale, il VEGF sembra essere uno dei fattori promuoventi la progressione dalle lesioni vulvari premaligne alla neoplasia <sup>50,51</sup>. Vari autori hanno dimostrato come un' iperespressione del VEGF sia associata ad una prognosi peggiore. Altri autori hanno confermato però che la sola determinazione del VEGF non correlata con lo stage, l'invasione e gli altri fattori prognostici, non può essere usata come un indicatore prognostico<sup>52,53</sup>. Lo studio del VEGF, non ha trovato indicazioni prognostiche per lo sviluppo delle metastasi linfonodali<sup>54</sup>.

Vari studi immunoistochimici sono stati condotti con dei markers di proliferazione cellulare al fine di individuare quelle pazienti con

un carcinoma a prognosi severa. Uno dei markers più studiati è il Ki-67 (denominato anche MIB-1 dall' anticorpo monoclonale che lo identifica). Ki-67 è una proteina nucleare non istonica, presente in tutte le fasi del ciclo cellulare tranne che nella fase G<sub>0</sub>, a tutt' oggi la sua funzione all' interno del nucleo non è ancora chiarita. Data la sua peculiarità di trovarsi all' interno dei nuclei delle sole cellule in proliferazione, esso viene proposto come markers di proliferazione. In vari studi condotti nel carcinoma dell' ovaio un' incremento della sua espressione è stato collegato con una prognosi peggiore ed un' diminuzione della sopravvivenza media. Risultati simili sono stati ottenuti anche per il carcinoma dell' endometrio <sup>55,56</sup>. I primi studi condotti con questa metodica sul carcinoma vulvare sembravano promettenti ed in linea con le altre osservazioni<sup>57</sup>. Successivamente oltre all' analisi quantitativa, bisognava porre anche un' analisi qualitativa sulla distribuzione del MIB-1, ovvero se con distribuzione focale o diffusa (quest' ultima associata ad una sopravvivenza inferiore)<sup>58</sup>. Si pensò anche che da un' analisi immunoistochimica con Ki-67 delle lesioni preinvasive fosse possibile riconoscere le pazienti che avrebbero avuto maggiori probabilità di sviluppare un ISCC. Da questo punto di vista l' analisi mediante MIB-1 non si è rivelata affidabile <sup>59,60</sup> . Attualmente l' interpretazione e la valutazione del MIB-1 come fattore prognostico è in una fase di valutazione.

Va ricordato che il significato di questi studi, soprattutto per la

ricerca di indicatori di prognosi, è fortemente limitato dalla rarità della malattia e dalla poca letteratura prodotta.

### **STADIAZIONE**

L'importanza di una corretta stadiazione, sta nel fatto di poter dare una diagnosi ed una prognosi più accurata possibile e di poter standardizzare ed applicare la terapia più efficace in base al grado di severità della malattia neoplastica.

La prima e sola classificazione clinica del tumore vulvare, usata per molti anni, fu la TNM staging system (tabella.III), basata sulle dimensioni e la localizzazione del tumore, la palpabilità dei linfonodi loco-regionali ed una ricerca di metastasi a distanza.

**Tabella III :** TNM staging system

<b>T:</b>	<b>Dimensioni tumore primitivo</b>
<b>T X</b>	Il tumore primitivo non può essere valutato
<b>T 0</b>	Nessun dato a sostegno di un tumore primitivo
<b>T is</b>	Carcinoma in situ
<b>T 1</b>	Tumore limitato alla vulva, dimensioni massime 2cm
<b>T 2</b>	Tumore limitato alla vulva, dimensioni massime superiori ai 2cm
<b>T 3</b>	Tumore di qualsiasi dimensione, con infiltrazione nell'uretra, vagina, perineo, ano
<b>T 4</b>	Tumore infiltrato nella parte superiore dell' uretra, in vescica, nella mucosa rettale, oppure esteso alle ossa.
<b>N</b>	<b>Linfonodi regionali</b>
<b>N X</b>	I linfonodi non possono essere valutati
<b>N 0</b>	Assenza di metastasi nei linfonodi regionali
<b>N 1</b>	Linfonodi regionali palpabili unilateralmente, non ingrossati, mobili
<b>N 2</b>	Linfonodi regionali palpabili bilateralmente, ingrossati, duri e mobili
<b>N 3</b>	Linfonodi ulcerati o fissi
<b>M</b>	<b>Metastasi a distanza</b>
<b>M X</b>	La presenza di metastasi a distanza non può essere valutata
<b>M 0</b>	Assenza di metastasi a distanza
<b>M</b>	Linfonodi pelvici profondi palpabili
<b>1a</b>	
<b>M</b>	Positività per altre metastasi a distanza
<b>1b</b>	

La stadiazione TNM clinica non può essere usata nè per la comunicazione scientifica, visto la variabilità del reperto obiettivo, nè per l'individuazione del percorso terapeutico più idoneo, perché le informazioni sull'esatta estensione della neoplasia sono disponibili solamente dopo il trattamento chirurgico. Inoltre si è visto che lo stato dei linfonodi regionali ha un impatto prognostico molto importante, ragion per cui devono essere investigati



accuratamente alla ricerca di micrometastasi, e deve essere posta una diagnosi differenziale tra i linfonodi metastatici e quelli ingrossati per cause infiammatorie. Da qui si capisce come il solo reperto palpatorio non può e non deve essere sufficiente, e può causare errori diagnostici. Per queste ragioni la valutazione clinica dello stato linfonodare può essere sede di errori di valutazione, tanto da risultare inappropriata nel 30% dei casi. La stadiazione TNM ha valore solo dopo una valutazione istopatologica postoperatoria, ed è attualmente usata nei referti patologici.

Per le ragioni sopraccitate, nel 1988 la FIGO abbandonò la classificazione TNM clinica e formulò una nuova stadiazione basata sull'evidenza chirurgica-patologica, sommando alla valutazione TNM patologica anche alcuni aspetti prognostici fondamentali, come la profondità di infiltrazione del tumore nello stroma. Nel 1994, la FIGO rielaborò la propria classificazione (tabella.IV), facendo un'ulteriore distinzione tra i tumori ad uno stadio precoce, definendo per la prima volta il carcinoma microinvasivo. Questo viene definito da una profondità di invasione dello stroma inferiore a 1mm, ed un diametro massimo inferiore ai 2cm (T1a), e corrisponde allo stadio Ia della FIGO staging system.

**Tabella IV** : Criteri diagnostici FIGO per il carcinoma vulvare

<b>FIGO stage</b>	<b>Tumore</b>	<b>Linfonodi</b>	<b>Metastasi</b>	<b>Descrizione</b>
<b>0</b>	Tis	N0	M0	Carcinoma in situ(Tis) ; VIN III, senza coinvolgimento linfonodale.
<b>I a</b>	T1a	N0	M0	Tumore confinato alla vulva, diametro lesione ≤ a 2cm, invasione stromale <0.1 cm, no coinvolgimento linfonodale.
<b>I b</b>	T1b	N0	M0	Come lo stage Ia, ma con profondità di invasione > 0.1cm.
<b>II</b>	T2	N0	M0	Come stage Ib, ma con diametro del tumore ≥ di 2 cm, no coinvolgimento linfonodale.
<b>III</b>	T3 T3 T1 T2	N0 N1 N1 N1	M0	Tumore di qualsiasi dimensione, con infiltrazione nell'uretra, vagina, perineo, ano oppure con metastasi linfonodali unilaterali.
<b>IV a</b>	T # T4	N2 N#	M0	Tumore di qualsiasi dimensione, con infiltrazione nella parte superiore dell' uretra, in vescica, nella mucosa rettale, esteso alle ossa pelviche oppure con metastasi linfonodali bilaterali.
<b>IV b</b>	T#	N#	M1	Qualsiasi tumore che comprende metastasi ai linfonodi pelvici o metastasi a distanza.

( # qualsiasi dimensione; is Tumore in situ).

## **CLINICA**

### **Sintomi e Diagnosi**

Molte pazienti giungono alla diagnosi di carcinoma vulvare totalmente asintomatiche. Se vi sono sintomi, prevalentemente si riscontra prurito, spesso associato a bruciore, dolore ed un senso di peso locale. Meno frequentemente possono esservi anche disuria e perdite ematiche genitali. Tali sintomi si presentano tipicamente in associazione a lesioni distrofiche della vulva od a preneoplasie. Molte pazienti possono contemporaneamente presentare più di un sintomo.

Un ritardo di settimane o mesi nel formulare una diagnosi di carcinoma vulvare è la conseguenza della mancanza od aspecificità dei sintomi, che fanno pensare ad alterazioni benigne della vulva

La lesioni cancerose possono essere visibili ad occhio, oppure scoperte dopo un' accurata palpazione. Queste hanno una grande variabilità di manifestazione; possono presentarsi sia come delle lesioni endofitiche con retrazioni ed ulcerazioni, che come esofitiche, protuberanti, con regioni biancastre o pigmentate, con masse di aspetto polipoide, verruchiforme o papulare. La superficie della lesione può essere liscia e non differenziata dall'epitelio circostante, o può essere rugosa e condilomatosa. Vi possono essere anche delle lesioni dure, con pelle aumentata di spessore e con un' aspetto di crosta <sup>2,40</sup>.

Nel carcinoma in fase avanzata, si possono rilevare erosioni od

ulcerazioni umide ed emorragiche e la formazione di noduli. L'ingrossamento, la fissità e/o l'ulcerazione dei linfonodi inguinali sono anch'essi segni di una neoplasia in fase avanzata<sup>2</sup>.

Le parti colpite più frequentemente sono l'interno delle grandi labbra e le piccole labbra, meno frequenti sono i riscontri nella regione clitoridea e nel perineo.

La diagnosi va posta dopo un esame obiettivo-palpatorio diretto di tutta la regione perineale, al fine di definire i rapporti tra lesioni, tessuti circostanti e piani profondi. Inoltre va effettuata un'indagine colposcopica della vagina e della cervice, alla ricerca di eventuali neoplasie squamocellulari frequentemente associate. Può aiutare nell'identificazione di lesioni cutanee atipiche l'impiego di colorazioni come l'acido acetico ed il blu di toluidina. Nell'indagine perciò vanno compresi una valutazione della cervice (anche mediante PAP test), dell'utero, degli annessi ed un esame rettale per la valutazione dei tessuti parametriali e della parete pelvica<sup>2</sup>.

L'esame citologico può essere d'aiuto. Il risultato del prelievo ha valore solamente se positivo, poiché un reperto citologico negativo non esclude con certezza la presenza di un carcinoma.

Tutte queste operazioni possono migliorare l'attendibilità della diagnosi clinica, ma solamente un'indagine istologica consente di porre diagnosi con certezza.

Questa si può eseguire mediante biopsia escissionale (local wide excision), ovvero un prelievo dell'intero strato cutaneo, compresi

un'abbondante porzione di stroma e i tessuti connettivali sottostanti. In pazienti con neoplasie palpabili la biopsia dovrebbe contenere il centro della massa tumorale con attorno dei margini liberi >1cm di epitelio normale, necessario per valutare l'estensione e la profondità della neoplasia. Nelle pazienti invece con lesioni dai contorni non facilmente distinguibili, l'applicazione di agenti topici, come soluzione al 3% di acido acetico, per l'individuazione di regioni infette dal virus dell' HPV ed il blu di Toluidina o di Collins, che colora tessuti nucleati in modo anormale (tra cui le zone con SCC), aiuta ad identificare le regioni sospette nelle quali fare poi la biopsia<sup>40</sup>. Bisogna ricordare che in presenza di lesioni erosive di tipo infiammatorio utilizzando il blu di toluidina si possono ottenere dei falsi positivi. Nell'eseguire la biopsia si deve evitare l'utilizzo dell'elettrobisturi, poiché i margini così prodotti presentano delle alterazioni che rendono impossibile un esame istologico delle eventuali alterazioni marginali.

Per aumentare la certezza diagnostica e per cercare dei markers che possano essere predittivi per lo sviluppo del tumore, recentemente si stanno impiegando le tecniche immunoistochimiche per l'analisi del campione biotico. Già la determinazione della sovra espressione della proteina p53, sono comuni nelle cellule basali delle lesioni semplici e cheratinizzanti. Altri markers sono stati impiegati, nella ricerca di informazioni prognostiche sia per lo sviluppo tumorale (se infiltrativo o no) sia

soprattutto per il possibile coinvolgimento linfonodale. Uno dei più usati è stato il MIB-1, ma con alterne interpretazioni sulla sua espressione e distribuzione ( espresso nei tumori di tipo classico, o bowenoide; solo nella porzione basale o in maniera diffusa) ed alla fine è risultato non essere indicativo per metastasi linfonodali. Altre pubblicazioni pilota hanno analizzato l' espressione della famiglia dei VEGF (vascular endothelial grow factor), con risultati incoraggianti.

Una volta accertata la presenza di un carcinoma vulvare, bisogna iniziare una attenta valutazione della dimensione, della superficie e della localizzazione del tumore, va valutato se unifocale o multifocale e lo stato linfonodale.

La positività o meno dei linfonodi, è il fattore prognostico principe. Dapprima vanno investigati con le tecniche di imaging e con agoaspirato sotto guida ecografica; qualora queste fallissero si può ricorrere anche alla tecnica del linfonodo sentinella.

Il linfonodo sentinella è definito come il primo linfonodo di drenaggio della regione interessata dal tumore: si assume che lo stato anatomo-patologico del linfonodo sentinella sia rappresentativo dello stato degli altri linfonodi loco regionali. Un sentinella negativo dovrebbe quindi predire l'assenza di metastasi. Questa tecnica è attualmente oggetto di studi, sia per la difficoltà di determinazione del primo linfonodo, sia per l'attendibilità dell'istologia <sup>49</sup>.

L' utilizzo dell' ecografia e della TAC addome è necessaria per chiarire la presenza di disseminazioni metastatiche ai linfonodi inguinali, pelvici ed aortici. Solitamente in presenza di lesioni clinicamente rilevabili ed avanzate, sospettate di aver invaso i tessuti della vescica o dell' intestino, si necessita di una cistoscopia e di una rettoscopia. Nella stadiazione prechirurgica, inoltre si effettua una ecografia epatica ed una radiografia al torace, per escludere l'eventualità di una, peraltro rara, disseminazione metastatica.

### **Tecniche di diagnostica per immagini**

Solitamente le metodologie per immagini non sono impiegate per la diagnosi primaria del carcinoma vulvare. In letteratura ci sono degli studi pilota molto promettenti. Uno di questi è l'analisi in vivo mediante OCT (optical coherence tomography). Usata da tempo in campo oculistico, si è rivelata promettente, non solo per l'individuazione delle neoplasie e delle preneoplasie della vulva, ma anche della cervice. Questa tecnica si basa sull'elaborazione di un'immagine al computer in relazione all'intensità dei fotoni di risposta emessi dal tessuto analizzato, dopo irradiazione con luce infrarossa a bassa potenza. Grazie a questa nuova metodica, è possibile ottenere informazioni sia strutturali che chimiche del tessuto analizzato <sup>61</sup>.

Normalmente tecniche come la TAC addome, l'ecografia del fegato

e la radiografia del torace, sono comunemente impiegate sia nella stadiazione prechirurgica, che durante il follow-up per evidenziare lo sviluppo di recidive linfonodali od espansioni pelviche.

La TAC e la RMN sono a tutt'oggi tra le tecniche di imaging maggiormente usate, sia per l'alta risoluzione, la capacità di scansione dei vari piani anatomici. Il valore della TAC per scoprire linfonodi metastatici resta alquanto incerto e limitato, mentre la capacità della RMN resta incerta. La RMN presenta una alta specificità (circa 100%) ma una bassa sensibilità (circa 50% ed anche meno). Questo dipende essenzialmente dai criteri di misurazioni per suddividere i linfonodi benigni da quelli metastatici. La misura di 10mm di diametro sull'asse minore, per i linfonodi addominali, e di 8mm per gli inguinali profondi, sembrano essere i limiti di demarcazione tra le due tipologie di linfonodi. Recentemente è stata proposta una RMN-linfografia mediante l'impiego di un particolare mezzo di contrasto lo USIOP (Sinerem®). Esso è composto da nano particelle (20nm) di ossido di ferro legate a molecole di destrano a basso peso molecolare. Queste molecole vengono selettivamente inglobate ed accumulate nei macrofagi dei linfonodi. I linfonodi metastatici, nei quali le cellule neoplastiche vanno a sostituirsi ai macrofagi, non accumulano l'ossido di ferro, rendendosi così facilmente visibili alla RMN. Questa tecnica sembra incrementare sia la sensibilità che la specificità per la determinazione dei linfonodi metastatici, ed



inoltre sembra poter scovare le micrometastasi all'interno di linfonodi normali per dimensioni<sup>62</sup>.

Utilizzata è anche l'ecografia dei linfonodi inguinali superficiali. Una tecnica molto promettente sembra essere l'ago aspirato (FNAC fine needle aspiration for cytology) sotto guida ecografica. La combinazione di queste due tecniche ha portato ad una sensibilità ed una specificità per i linfonodi positivi, entrambe prossime al 100% (93 e 100%). Naturalmente l'impiego di questa metodica è complesso, sia per le difficoltà di diagnosi differenziale tra linfonodi benigni e maligni che per le difficoltà di pungere correttamente il linfonodo metastatizzato. Il limite di questa tecnica risulta essere operatore dipendente, e proprio per questo attualmente non è una metodica standardizzata <sup>63</sup>.

## **FATTORI PROGNOSTICI**

Il carcinoma squamocellulare della vulva, segue tre differenti metodi di invasione:

- Mediante accesso diretto ai tessuti ed organi circostanti, sviluppandosi e coinvolgendo dapprima strutture vicine come la vagina, l'uretra, il perineo e l'ano, poi fino a coinvolgere organi pelvici più distanti come la vescica, la mucosa rettale e le ossa pelviche.
- Mediante embolizzazione, attraverso i vasi linfatici, dei linfonodi regionali. L'invasione linfatica da parte delle cellule tumorali, solitamente avviene dapprima coinvolgendo i linfonodi inguinali superficiali e successivamente invadendo anche i linfonodi inguinali profondi e i linfonodi pelvici.
- Nella terza via di diffusione, anche se più rara, il tumore si propaga mediante invasione ematogena, con formazione di metastasi a distanza solitamente al polmone, ma anche al fegato, alle ossa, al derma.

Per il trattamento di pazienti affette da carcinoma vulvare, a prescindere da alcune condizioni cliniche come età e condizioni generali, sono importanti per la formulazione della prognosi i seguenti fattori:

- Dimensioni del tumore (stadiazione FIGO o TNM)
- Profondità di infiltrazione
- Invasione dei linfonodi

### **Dimensioni del tumore**

Una corretta stadiazione alla diagnosi, assume un ruolo fondamentale per la prognosi, poiché la sopravvivenza è direttamente proporzionale con l'estensione della neoplasia. La sopravvivenza media a 5 anni dalla diagnosi, per un carcinoma invasivo vulvare correlata con lo stadio I della stadiazione FIGO oscilla tra il 100% ed il 90%, mentre per lo stadio II si va da un 86,2% ad un 77%, per lo stadio III da un 59,4% ad un 51,3% ed infine per lo stadio IV si va da un massimo di 29,8% (stadio IVa) ad un minimo di 18-20%(stadio IVb)<sup>64,65</sup>. Inoltre la stadiazione è indicativa dell'incidenza delle metastasi linfonodali.

### **Profondità di invasione**

La determinazione della profondità di invasione della neoplasia all'interno dello stroma è correlata sia con lo sviluppo di metastasi linfonodali sia con lo sviluppo di recidive.

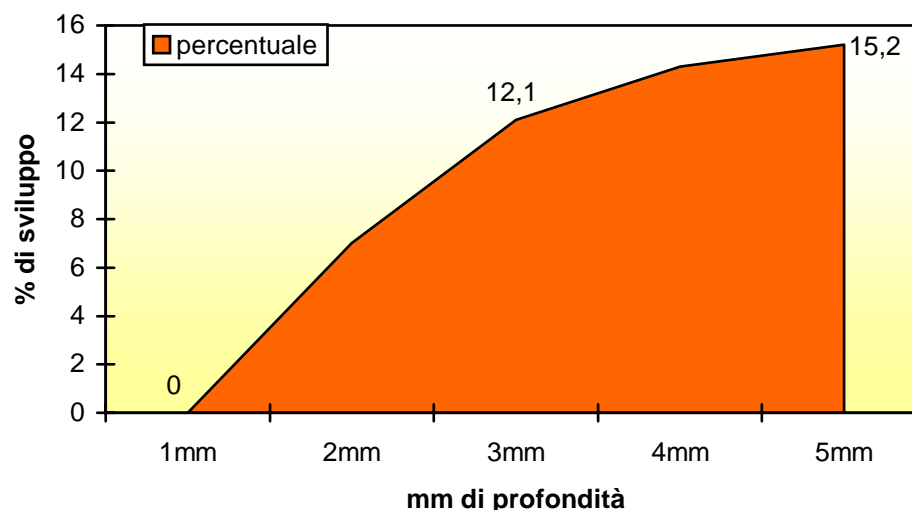
Nelle neoplasie precoci, chiamate anche carcinoma vulvare invasivo superficiale, la misurazione della profondità di invasione determina un comportamento terapeutico differente. Il diametro tumorale

nello stage I, da solo non è un indice predittivo attendibile dello stato linfonodale. Infatti in uno studio di 190 casi allo stadio I FIGO, risultò che il 36% avevano metastasi linfonodali, un fattore che fa diminuire la sopravvivenza media ai 5 anni dal 97,7% dei casi con linfonodi negativi al 78% nelle pazienti con linfonodi positivi<sup>66</sup>. Proprio per questo motivo, la FIGO introdusse nel 1994 un' ulteriore suddivisione dei tumori allo stadio I (tumori con diametro massimo inferiore ai 2cm), in 2 subclassi: lo stadio Ia che ha una profondità di invasione inferiore a 1mm, e lo stadio Ib che invece presenta una infiltrazione maggiore di 1mm. Questo perché si è vista una forte correlazione tra la profondità di invasione e l'incidenza di sviluppo di metastasi o recidive linfonodali (tabella. V, figura 3).

La scelta di porre come limite tra Ia e Ib la misura di 1mm di invasione, è stata decisa analizzando la frequenza di metastasi linfonodali alla diagnosi e della frequenza di sviluppo di recidive linfonodali dopo trattamento.

**Tabella V:** Profondità di invasione e sviluppo di metastasi linfonodali

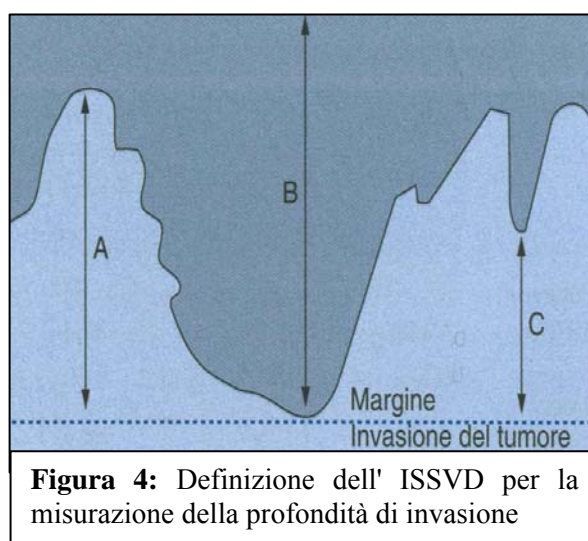
<b>Profondità di invasione</b>	<b>Quantità (n)</b>	<b>Numero Linfonodi +</b>	<b>%</b>
≤ 1 mm	163	0	0
1,1- 2mm	145	11	7,7
2,1-3mm	131	11	8,3
3,1-5	101	27	26,7
> 5mm	38	13	34,2
<b>Totale</b>	<b>578</b>	<b>62</b>	<b>10,7</b>



**Figura 3:** La frequenza delle metastasi linfonodali aumenta rapidamente con la profondità di invasione > di 1mm

La misurazione della massima profondità di infiltrazione ha una particolare importanza e per questo è stato standardizzato il metodo proposto da

Wilkinson. Con il termine profondità di invasione viene indicata la misura che intercorre tra la membrana basale delle papille cutanee più vicine alla sede del tumore con il



**Figura 4:** Definizione dell' ISSVD per la misurazione della profondità di invasione

punto di invasione più profondo nello stroma (figura.4 indicato con A). Mentre con il termine di spessore del tumore viene indicata la misura che intercorre tra la superficie del tumore ed il punto di massima invasione (figura 4 indicato con B). Questo perché

andando a misurare dalla superficie sovente vi era una sottostima od una sovrastima della reale infiltrazione, a seconda che il tumore si presentasse con lesioni ulcerate o papillomatose<sup>2,3,67</sup>.

Le recidive dopo trattamento chirurgico dei casi Ia, sono estremamente rare, allo stato attuale sono state riportate in letteratura solamente due casi<sup>68,69</sup>.

Solitamente il trattamento chirurgico del carcinoma vulvare consiste in una vulvectomy radicale ed una linfadenectomia inguinale bilaterale. Questa procedura ha comunque un' alta morbilità soprattutto nelle pazienti più anziane. Lo stadio Ia, invece, presenta una incidenza per le metastasi linfonodali minima, troppo bassa per giustificare questo approccio aggressivo. Si è allora standardizzata una terapia chirurgica più conservativa, che prevede la biopsia escisionale allargata (wide excision) con margini sani di sicurezza di 1 cm, senza praticare la linfadenectomia inguinale<sup>44,70</sup>. Importante è mantenere dei margini liberi di sicurezza  $\geq$  di 1cm, visto che sono un importante fattore predittivo per lo sviluppo di recidive. Infatti dapprima il lavoro di Heaps *et al.*<sup>71</sup> mostrò come il 50% delle recidive locali avvenissero in pazienti con dei margini di resezione liberi di dimensioni inferiori agli 8mm, mentre de Hullu *et al.*<sup>70</sup> dimostrò come nessuna paziente con margini liberi superiori agli 8mm sviluppasse recidive. Attualmente i margini liberi devono avere una misura  $\geq$  1cm.

## **Invasione dei linfonodi**

La presenza od assenza di coinvolgimento linfonodale, è il fattore prognostico più importante, infatti una sua positività determina un riduzione della sopravvivenza di quasi il 50% (dal 90% a meno del 50% <sup>72</sup>).

Nella tabella VI è riportata una revisione della letteratura sugli indici di sopravvivenza a 5 anni di pazienti con metastasi linfonodali (tabella VI).

**Tabella VI:** Indici di sopravvivenza a 5 anni (%) con metastasi linfonodali riportati in letteratura.

<b>Autore/ anno</b>	<b>Quantità (n)</b>	<b>Morte a causa della malattia (quantità n)</b>	<b>Indice di sopravvivenza a 5 anni (%)</b>
Morley (1976)	62	38	38,7
Green (1978)	46	18	60,8
Benedet (1979)	34	16	52,9
Curry (1980)	52	30	42,3
Cavanagh (1986)	58	36	37,9

In letteratura l'incidenza di metastasi linfonodali inguinali è variabile; Hopkins et al. riportano una incidenza di linfonodi positivi che va dal 14 al 92% dallo stadio I-IV <sup>73</sup>; Homesley et al., in uno studio condotto dal Gynecologic Oncology Group su 588 pazienti affette da carcinoma della vulva, riportano risultati simili (18,9% per lesioni  $\leq$  2 cm e 41,6% per lesioni  $>$  2 cm)<sup>74</sup>. Nella

tabella VII è riportata una revisione della letteratura in merito alla frequenza di metastasi linfonodali inguinali in base allo stadio del tumore <sup>75</sup> (tabella VII).

**Tabella VII:** Frequenza delle metastasi linfonodali in base allo stadio (FIGO)

<b>Autore</b>	<b>Stadio I</b>	<b>Stadio II</b>	<b>Stadio III</b>	<b>Stadio IV</b>
Donaldson 1981	15%	49%	80%	100%
Hacker 1983	11%	25%	71%	100%
Figge 1985	5%	21%	39%	33%
Boyce 1985	13%	27%	56%	100%
Benedetti Panici 2002	12%	36%	77%	100%

Una caratteristica di questo tipo di espansione metastatica è la sua prevedibilità. Partendo dalle conoscenze anatomiche, si può dedurre che i linfonodi inguinali superficiali siano la prima sede di metastasi, seguiti dalla stazione linfonodale femorale e successivamente dai linfonodi pelvici. Questa teoria veniva confermata anche da uno studio retrospettivo di 157 casi, in cui tutte le metastasi ai linfonodi inguinali profondi, erano occorse a pazienti già affette da metastasi ai linfonodi inguinali superficiali <sup>76</sup>. Altri studi clinici hanno invece evidenziato che non tutti i carcinomi vulvari seguono questo iter. Infatti, in uno studio del 1992 condotto dal Gynecologic Oncology Group (GOG), pazienti con carcinoma vulvare allo stadio I, vennero sottoposte alla sola linfadenectomia superficiale. Si evidenziò come in questa serie di



casi ci fosse un' incidenza maggiore di recidive ai linfonodi ipsilaterali, nonostante i linfonodi inguinali superficiali risultassero negativi. Questo venne spiegato con una probabile diffusione attraverso i linfonodi inguinali profondi. Anche nelle osservazioni di Burke et al. si presentò un' incremento dell' incidenza di recidive in pazienti con stadio T1 o T2. Questa teoria di un' irregolare drenaggio venne successivamente formulato in una review di Levenback <sup>54,77,78</sup>. In uno studio recente di Gordinier *et al.* di fronte a dati elevati (9%) di recidive metastatiche linfonodali con linfonodi superficiali negativi, venne formulata l'ipotesi alternativa che delle micrometastasi fossero lasciate in loco durante la linfadenectomia inguinale superficiale<sup>79</sup>. Per questi motivi attualmente non viene indicata la linfadenectomia inguinale superficiale, ma viene raccomandata una linfadenectomia inguinofemorale completa.

Studi sul drenaggio linfatico della vulva dimostrano come le labbra e tutta la regione laterale della vulva hanno un deflusso linfatico prettamente ipsilaterale. Questa osservazione è stata confermata dall' esperienza clinica secondo cui in pazienti con tumore lateralizzato, lo sviluppo di metastasi controlaterali in assenza di metastasi ipsilaterali è raro. Viene così definito un tumore laterale, come una neoplasia i cui margini distano almeno 1cm dalla linea mediana e dalle strutture mediane <sup>80</sup>. Se un tumore è lateralizzato, si procede dapprima alla sola linfadenectomia inguinale ipsilaterale, qualora il riscontro istologico risultasse positivo per

metastasi linfonodali, le opzioni terapeutiche sono duplici ed oggetto di controversie; o si procede ad una linfadenectomia controlaterale, oppure ad una terapia radiante dei linfonodi controlaterali. Lo sviluppo di recidive controlaterali dopo emivulvectomy e linfadenectomia inguinale ipsilaterale, è un evento estremamente raro. Recentemente Jackson *et al.* hanno riportato un caso di recidiva sviluppatosi dopo 2,5 anni dal trattamento ipsilaterale, l'unico riportato in letteratura <sup>81</sup>.

La presenza di metastasi linfonodali unilaterali o bilaterali, il coinvolgimento dei linfonodi pelvici, ed il numero dei linfonodi positivi, sono tutti fattori che determinano un progressivo calo della sopravvivenza media ai 5 anni <sup>2</sup> (tabella VIII).

**Tabella VIII :** Sopravvivenza correlata con lo stato linfonodale

<b>Stato linfonodale</b>	<b>Sopravvivenza a 5 anni</b>
Linfonodi negativi	66,8%
Linfonodi positivi omolaterali	55,1%
Linfonodi positivi controlaterali	33,1%
Linfonodi positivi pelvici	19,7%
<b>N. linfonodi positivi</b>	
1	63,7%
2	43,4%
3	33,9%
4 o più	18,4%

Anche la morfologia delle metastasi nei linfonodi positivi ha una importanza prognostica. Negli anni novanta già con i primi studi di Origoni *et al.*<sup>82</sup> si dimostra che nei pazienti con linfonodi positivi vi è una differenza significativa nella sopravvivenza, dipendente sia dalle dimensioni dei linfonodi coinvolti, sia dalla presenza od assenza di invasione extracapsulare. Pazienti che hanno un diametro dei linfonodi positivi inferiore ai 5mm presentano una sopravvivenza media ai 5 anni del 90,9%, comparata con il 41,6% per linfonodi positivi con diametro compreso tra i 5 ed i 15mm ma soprattutto comparata con una sopravvivenza del 20,6% per diametri linfonodali superiori ai 15mm. Allo stesso modo, se il coinvolgimento linfonodale rimane intracapsulare, la sopravvivenza ai 5anni è del 85,7%, mentre se vi è una invasione extracapsulare, essa decresce al 25%. Anche uno studio di van der Velden *et al.*<sup>83</sup> condotto su pazienti che presentano il coinvolgimento di un singolo linfonodo positivo, la presenza di una invasione extracapsulare diminuisce la sopravvivenza dall' 88% (14 pazienti su 16) per metastasi intracapsulari, al 44% (7 su 16).

### **Mappatura linfatica**

L'uso del linfonodo sentinella e del mappaggio linfatico nel trattamento del carcinoma vulvare, prende spunto dal successo terapeutico che questa metodica ha avuto nel trattamento del carcinoma della mammella e del melanoma cutaneo, tanto che

sono entrate nella pratica clinica come operazioni routinarie per la stadiazione.

Il linfonodo sentinella è definito come il primo linfonodo della catena linfatica che riceve il flusso linfatico dalla lesione. Per tale motivo dovrebbe essere il primo sito coinvolto da metastasi e perciò può essere rappresentativo dello stato della catena linfonodale. Questa tecnica di mappatura linfatica si avvale di due distinte metodiche: mediante iniezione intradermica attorno al tumore del blu isosolfano, un colorante vitale (blue dye), dopo circa 5 minuti i canali afferenti dei linfonodi regionali divengono visibili, con la tipica colorazione blue. L'altra tecnica è l'individuazione del linfonodo sentinella mediante linfoscintigrafia intraoperatoria con utilizzo di sonda gamma. In questa tecnica viene iniettato del Tc<sup>99</sup> attorno alla lesione sospetta, e poi sottoposte a linfoscintigrafia con contatore gamma <sup>70</sup>.

I primi studi vennero condotti nel 1979 da Di Saia *et al.*, che fu il primo a postulare che i linfonodi inguinali superficiali potessero servire da spia per la presenza di eventuali lesioni metastatiche più profonde. Nel 1994 Levenback *et al.* <sup>84</sup> pubblicarono il primo studio sul linfonodo sentinella mediante l'impiego del colorante blu di isosolfano. Già in questo studio esteso a 52 casi, le percentuali di identificazione si attestavano prossime al 90%, l'istopatologia del linfonodo sentinella era rappresentativa dell'istopatologia degli altri linfonodi ed inoltre non furono rilevate complicanze

postoperatorie. Nel 1997 uno studio di DeCesare *et al.* riporta i primi risultati ottenuti mediante l'impiego della tecnica della linfoscintigrafia intraoperatoria, che assicura una precisione ancora maggiore, mentre in una pubblicazione del 1998 di de Hullu *et al.* propose una tecnica combinata con la linfoscintigrafia preoperatoria e la determinazione intraoperatoria mediante colorazione vitale per eliminare la radioattività di fondo presente nel tumore primario e nella vescica, che rende difficile il riconoscimento del primo linfonodo nella regione inguinale <sup>70, 85</sup>.

Allo stato attuale, la capacità di identificazione del linfonodo sentinella sono prossime al 100%, mentre i falsi negativi sono molto pochi ed i casi riportati sono solitamente quelli del primo periodo di approccio a questa tecnica.

Un'altro aspetto importante nel considerare la validità della tecnica del linfonodo sentinella è il cosiddetto periodo di apprendimento (*learning curve*), necessario sia al chirurgo che al medico di medicina nucleare, per individuare correttamente il linfonodo sentinella, per non produrre dei falsi negativi. Tumori come il melanoma necessitano di un numero minimo di 30 casi per finire il periodo di apprendimento, mentre in una recente articolo sul numero minimo di casi per il carcinoma della mammella Sanidas *et al.*<sup>86</sup> conclusero che non è possibile fissare un numero di casi, poiché molto dipende dall'abilità del chirurgo, ma comunque raccomandano un numero minimo di 20-30 casi. Se

consideriamo la rarità del carcinoma vulvare, ci si rende conto quanto sia difficile accumulare l'esperienza necessaria per incrementare l'efficacia di questa tecnica, infatti nessun chirurgo riesce a vedere almeno 20 casi in un breve arco di tempo. A tal proposito de Hullu ha proposto come termine del periodo di apprendimento, almeno 10 procedure consecutive con un valore del 100% di identificazione <sup>87,88</sup>.

Da un punto di vista anatomopatologico, anche la tecnica istologica per esaminare il linfonodo sentinella è argomento di discussione ed oggetto di differenti studi. Ci sono metodi per la valutazione intraoperatoria o postoperatoria del linfonodo sentinella. Le tecniche intraoperatorie, come per esempio le sezioni a freddo (frozen sections) hanno il grande vantaggio che, se necessario, una completa linfadenectomia può essere effettuata all'interno della stessa sessione operatoria, senza la necessità di effettuare un secondo intervento. La sezione esaminata normalmente è una sola per linfonodo, la mediale, ed esaminata mediante colorazione con ematossilina-eosina. La sensibilità di questa tecnica è prossima all'80%.

La valutazione postoperatoria, permette invece un'analisi maggiormente accurata, anche se più lenta, del linfonodo. Vari protocolli sono stati elaborati, molti in combinazione con un'indagine immunoistochimica del preparato. Un'ultrastaging patologico venne proposto da Terada *et al*<sup>89</sup>. solamente per i

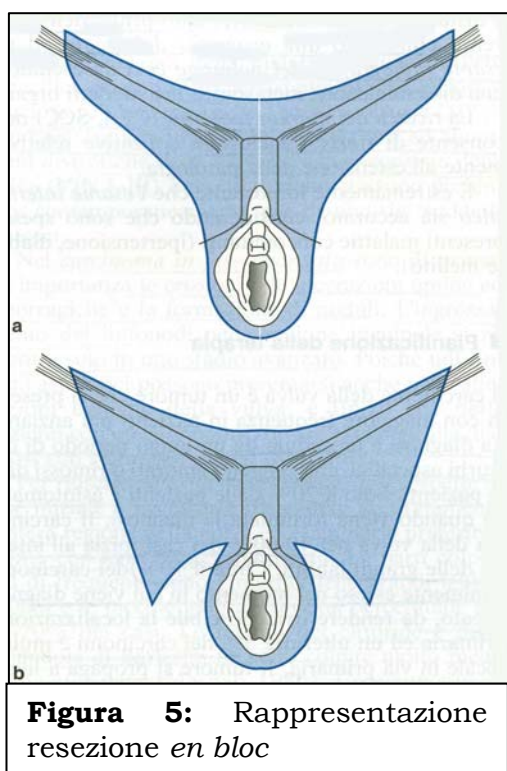
linfonodi risultati negativi all' analisi della sola sezione centrale; questi vengono suddivisi in 15-20 sezioni, alcune indagate con ematossilina-eosina ed altre con l'indagine immunohistochimica per le citocheratine (AE1/AE3 anticheratine). Con questa metodica è stato possibile individuare la presenza di micrometastasi linfonodali.

Il linfonodo sentinella, che in caso di linfonodo negativo potrebbe evitare una linfadenectomia inguinale superficiale e profonda, si presenta come una tecnica investigativa dello stato linfonodale estremamente promettente; ma per le ragioni e le complessità sopraccitate, attualmente necessita di maggiori approfondimenti e di standardizzazioni, ed è ancora nella fase sperimentale.

## TERAPIA

Storicamente il trattamento chirurgico ha sempre avuto un ruolo fondamentale nella terapia del carcinoma vulvare. Già nel 1912 Basset descriveva la vulvectomia totale e la linfadenectomia inguinale e femorale come la procedura chirurgica minima per carcinoma vulvare.

Per molto tempo la tecnica chirurgica di elezione rimase l'asportazione *en bloc* (chiamata anche butterfly incision) della vulva con le ghiandole annesse assieme alle pieghe cutanee inguinali, ai linfonodi inguinali e femorali, e spesso erano associati anche i linfonodi pelvici (figura 5). Già dai primi studi di Stoeckel (1930), Taussing (1935) e Way (1948), mediante questa tecnica



**Figura 5:** Rappresentazione resezione *en bloc*

operatoria era possibile ottenere delle buone sopravvivenze medie. Questa tecnica era applicata indistintamente a qualsiasi stadio tumorale, sia esso precoce (stadio I, II) o tardivo (stadio III e IV) <sup>90</sup>.

Questi risultati incoraggianti erano ottenuti al prezzo di un'alta mortalità perioperatoria e morbidità. Infatti le pazienti più

anziane passavano un lungo periodo post operatorio ospedalizzate,



distese, per permettere la guarigione di una ferità così estesa, spesso complicata da deiscenze e guarigioni di seconda intenzione; per questi motivi erano anche soggette ad infezioni ricorrenti ed a complicazioni tromboemboliche spesso fatali. Le pazienti sottoposte ad una linfadenectomia così estesa sviluppavano un linfedema agli arti inferiori massivo e disabilitante. Inoltre vi erano da mettere in conto le complicazioni psicologiche dovute ad una inevitabile alterazione dell'immagine corporea e della vita sessuale totalmente compromessa. Per ridurre i rischi derivanti da una operazione così mutilante, agli inizi degli anni '80, Byron et al. ed Hacker et al., dimostrarono come nei tumori precoci, si potessero avere degli eccellenti risultati, mediante la tecnica della *tripla incisione*. Questa si avvale di una escissione ovale della regione vulvare, e separatamente di una linfadenectomia inguinale eseguita mediante due incisioni separate. I valori di sopravvivenza ottenuti sono equiparabili a quelli ottenuti con la tecnica *en bloc*, ma diminuiscono notevolmente sia la morbidità che la mortalità postoperatoria. Il rischio di sviluppare recidive cutanee nell'area delle pieghe inguinali (*skin bridges recurrence*) si è dimostrato essere molto raro, soprattutto se il coinvolgimento linfonodale è negativo. Anche per le neoplasie in stadio avanzato (stage III e IV), trattate con la metodica della tripla incisione, si sono ottenute delle sopravvivenze superiori al 48% <sup>2,12,42,70</sup>.

Una volta accettata la tecnica conservativa della tripla incisione, a discapito della più demolitiva resezione *en bloc*, si pose il problema di determinare quali fossero i margini di sicurezza. Questi sono definiti come il margine di tessuto sano che deve essere asportato assieme al tumore primario. Attualmente 1cm è la misura di sicurezza più adeguata, che combina la minor probabilità di recidiva locale, con il miglior risultato estetico. Vari studi hanno dimostrato come con una misura superiore agli 8mm non si siano rischi di sviluppare recidive locali <sup>70,97</sup>.

Il trattamento standard del carcinoma vulvare è sempre di tipo chirurgico, ma per gli stadi avanzati o per alcune procedure particolari, spesso viene associato un trattamento adiuvante o neoadiuvante di tipo radiante e/o chemioterapico.

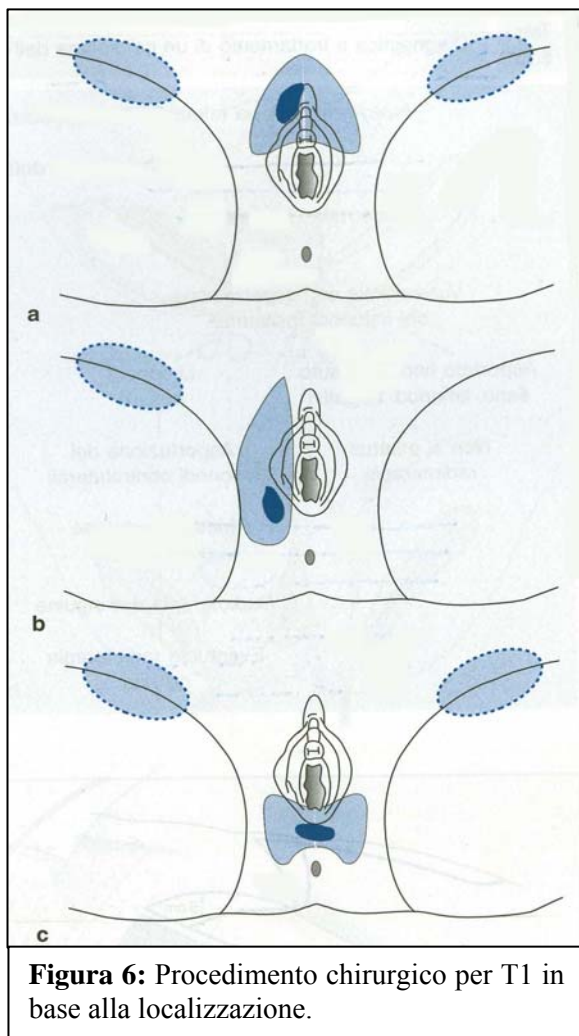
Il grado di radicalità dell' intervento chirurgico deve essere modulato in relazione ai fattori prognostici di maggior importanza, ossia le dimensioni della lesione e lo stato linfonodale. Possiamo suddividere le opzioni terapeutiche in base allo stato tumorale, ovvero per carcinomi vulvari allo stadio precoce ed allo stadio avanzato.

### **Trattamento delle lesioni allo stadio iniziale**

Per le lesioni allo stadio iniziale il trattamento è maggiormente conservativo e varia a seconda del variare dei fattori prognostici maggiori.

Per lesioni unifocali allo stadio IA, (microinvasivo del diametro inferiore a 2 cm e con profondità di invasione inferiore al millimetro), vi è ad oggi consenso unanime che possano essere trattate con la semplice escissione bioptica allargata, con la presenza di margini liberi superiori al centimetro. I dati della letteratura dimostrano la rarità di metastasi linfonodali (< 1%); è pertanto lecita l'omissione della linfadenectomia.

Una revisione della letteratura, che prende in considerazione



lesioni  $\leq 2$  cm con profondità di invasione  $\leq 5$  mm, indica un tasso di recidiva locale del 7,2% per l'escissione radicale a margini liberi, e del 6,7% per la vulvectomy radicale. Tale differenza non è statisticamente significativa. Pertanto in caso di lesione vulvare con diametro  $\leq 2$  cm è consigliata un'ampia biopsia escissionale: se la valutazione anatomicopatologica la classifica come

stadio IA non sarà necessario né indicato alcun ulteriore

trattamento. Qualora la lesione superi i 5 mm di profondità di invasione, sarà necessaria una radicalizzazione dell'exeresi vulvare, con raggiungimento, sul margine profondo, della fascia inferiore del diaframma urogenitale. Negli stadi T1b-T2 vi è l'indicazione per l'emivulvectomy se la neoplasia ha una localizzazione unilaterale risparmiando, quando possibile, l'asportazione dell'area clitoridea, inoltre viene eseguita una linfadenectomia omolaterale (figura.6b). La vulvectomy totale è indicata invece nei casi di bilateralità o nelle lesioni multifocali<sup>91</sup>. Per le localizzazioni centrali, come neoplasie nella zona clitoridea oppure situate nella zona della commissura posteriore, si può effettuare sia una vulvectomy totale, che una vulvectomy anteriore o posteriore, seguite sempre da linfadenectomia bilaterale mediante doppia incisione inguinale (figure. 6a, 6c). Recentemente è stata proposta anche l'applicazione di una radioterapia neoadiuvante prechirurgica per permettere la conservazione della zona clitoridea <sup>82</sup>.

La recidiva linfonodale è un fattore correlato ad un alto tasso di mortalità, per cui tutte le pazienti con tumori T1b e T2 con invasione nello stroma che superi il millimetro, si deve eseguire una linfadenectomia inguinale (ipsilaterale o bilaterale a secondo della sede del tumore)<sup>90</sup>.

Nei casi sottoposti a linfadenectomia omolaterale in cui al riscontro anatomico-patologico siano state rilevate metastasi linfonodari, l'intervento va adeguato alla gravità della situazione:

Se vi è il coinvolgimento di un solo linfonodo con micrometastasi inferiore ai 5mm di diametro, esso va seguito mediante stretto follow up.

Se invece vi è il coinvolgimento di 2 o più linfonodi con micrometastasi, oppure la presenza di una macrometastasi con dimensioni superiori ai 10mm di diametro, oppure una qualsiasi evidenza di una espansione extracapsulare, qualora la paziente non sia già stata trattata con radioterapia preoperatoria, vi sono le indicazioni per eseguire una radioterapia postoperatoria bilateralmente nelle zone inguinali e pelvica <sup>90,92,97</sup>.

Attualmente si preferisce eseguire una radioterapia postoperatoria nel trattamento dei linfonodi pelvici positivi, piuttosto che eseguire un secondo intervento chirurgico.

Per tutte le restanti lesioni il trattamento chirurgico d'elezione è la vulvectomia radicale, o radicale modificata, con linfadenectomia inguino-femorale bilaterale<sup>90</sup>.

### **Trattamento degli stadi avanzati**

Con il termine di tumori allo stadio avanzato vengono genericamente identificate tutti i carcinomi vulvari appartenenti allo stadio FIGO III e IV. Conseguentemente abbiamo tre diversi scenari di malattia avanzata:

- Il primo con una lesione estesa localmente, che coinvolge anche le strutture mediane come l' uretra, la vagina e l'ano ma

senza avere un coinvolgimento linfonodale,

- Il secondo tipo, è rappresentato da una lesione scarsamente estesa localmente ma con un coinvolgimento linfonodale scoperto dopo linfadenectomia.
- Il terzo tipo, è rappresentato da una estesa lesione con invasione di varie strutture pelviche e con reperti di metastasi linfonodali francamente evidenti <sup>93</sup>.

Questo gruppo di neoplasie rappresentano circa il 20% dei casi che giungono all'osservazione, e sono caratterizzate da una prognosi molto severa con un' alto tasso di recidive e di sviluppo di metastasi <sup>2</sup>.

L' approccio terapeutico tradizionale verso delle lesione vulvari così estese è chirurgico, mediante una vulvectomy ultraradicale allargata alle strutture pelviche invase dall' espansione tumorale, con resezione operata con ampi margini di sicurezza, accompagnata inoltre da una linfadenectomia bilaterale. Questo tipo di intervento particolarmente demolitivo è caratterizzato da una serie di sequele postoperatorie che causano un' alta morbilità e mortalità sia intra che postoperatoria. Nelle pazienti anziane per questo motivo tale procedimento terapeutico risulta inappropriato. Attualmente è indicato solo in casi selezionati di malattia completamente resecabile, o nelle pazienti che hanno sviluppato delle recidive pelviche o perineali dopo trattamento primario. In lesioni così estese difficilmente la sola chirurgia può essere

applicata con intento curativo<sup>94</sup>.

Vi è anche l'impiego di un'altra tecnica chirurgica meno demolitiva, ovvero della vulvectomy radicale modificata. Con questa metodica si esegue una vulvectomy radicale con estensione della resezione alla singola struttura coinvolta (uretrectomia sottosfinterica, asportazione parziale dello sfintere anale). Nelle neoplasie preclitoridee che si estendono intorno al meato uretrale è necessaria l'asportazione del meato uretrale e, per maggior sicurezza, del margine libero l'asportazione di parte o tutta l'uretra extradiaframmatica. Nelle neoplasie posteriori che coinvolgono il perineo ostetrico sino a lambire e circondare l'orifizio anale è necessario sempre assicurarsi un margine su tessuti sani asportando parzialmente la mucosa anale, previa divulsione, e resecare parzialmente il bordo inferiore del muscolo sfintere esterno dell'ano. La necessità di ottenere margini di resezioni liberi può comportare, un'elevata percentuale di complicanze quali l'incontinenza urinaria e fecale <sup>96</sup>.

L'approccio combinato di terapia radiante prechirurgica sembra dare degli ottimi risultati. Questa si basa sull'impiego di una radioterapia preoperatoria a dose moderata (36- 54 Gy) estesa a tutta la zona pelvica, allo scopo di ridurre le dimensioni del tumore, ristadiarlo ad un livello inferiore, e successivamente programmare un'intervento chirurgico di resezione completa del letto tumorale meno demolitiva. La resezione è eseguita solamente

attorno al letto tumorale, poiché eventuali foci tumorali presenti nella regione vulvare sono già stati sterilizzati durante la radioterapia. Questo approccio permette un controllo ottimale del tumore, con una conservazione dell' integrità dei tessuti vulvari ed una buona conservazione della continenza urinaria e fecale. Inoltre non è necessario eseguire la linfadenectomia, visto che i linfonodi di questa regione, sono già stati trattati durante la radioterapia <sup>90</sup>.

Nella terapia neoadiuvante è in fase di sperimentazione e sembra promettere buoni risultati la chemioradioterapia. Questa è una combinazione di radioterapia (45-55 Gy in 28-30 sedute) in concomitanza con due cicli di chemioterapia con mitomicina C e 5 fluoro uracile (5FC), ma anche con cisplatino e 5FU. Anche l'impiego della brachiterapia, ovvero dell'irradiazione intracavitaria dei tumori estesi alla vagina ed all' ano, mediante radioisotopi ha ottenuto dei buoni risultati<sup>90,95</sup>.

Ogni operazione più o meno estesa, deve essere seguita anche da un chirurgo plastico al fine di ricostruire sia anatomicamente che funzionalmente la regione lesa.

### **Complicanze postoperatorie**

Le complicanze postoperatorie dipendono dall' estensione e dalla radicalità dell' intervento chirurgico, se è stata eseguita una linfadenectomia inguinale unilaterale o bilaterale.

La maggioranza delle complicanze postoperatorie precoci sono



dovute ad deiscenza, infezioni e necrosi delle ferite inguinali, che determinano una prolungata ospedalizzazione. Normalmente è presente una parestesia locale a livello della ferita. Altre complicanze possono presentarsi, come infezioni urinarie, trombosi dei vasi profondi e sviluppo di embolie polmonari, infarto miocardico ed emorragie. Lo sviluppo di un linfocisti, un sieroma od un rigonfiamento a livello inguinale, sovente accompagnato da edema del monte pubico e successivamente esteso anche agli arti inferiori, sono sequele comuni dopo un' intervento di chirurgia radicale coinvolgente i linfonodi.

Le complicanze tardive comprendono l'edema cronico agli arti inferiori se è stata eseguita una linfadenectomia inguinale, linfangiti ricorrenti, sviluppo di ernie inguinali, incontinenza urinaria, con o senza prolasso genitale. Lo sviluppo di osteomieliti pubiche, e di fistole rettovaginali o rettoperitoneali sono delle complicanze relativamente rare.

Tra le complicanze postoperatorie vanno inserite anche la morbidità conseguente ad un' intervento di vulvectomy totale.

Questa morbidità colpisce vari aspetti:

- Vulva: sviluppo di edema vulvare, particolarmente se la paziente è stata sottoposta anche a terapia radiante, l' edema può essere più marcato e persistente. Inoltre l' epidermide risulta essere dura ed anelastica, vi possono essere anche delle ulcerezioni. Tutto ciò, associato ad un' alterata o ridotta

sensibilità vulvo-vaginale, può rendere difficoltoso il coito.

- Vagina: sviluppo di stenosi.
- Zona perineale e perianale: difficoltà e dolore nella posizione seduta per lungo periodo, sviluppo di costipazione e tenesmo. La paziente può diventare incontinente dopo trattamento per lesioni posteriori.
- Uretra: problemi alla minzione, come dolore, interruzione del flusso urinario, sviluppo di un flusso angolato, o scarsa minzione per la presenza di stenosi uretrali; incontinenza urinaria.
- Funzioni sessuali: la resezione chirurgica del clitoride è ovviamente associata ad una diminuzione o perdita della funzionalità sessuale, associata ad una trasfigurazione dell'immagine percepita della zona genitale che determina lo sviluppo di una sequele di problemi psicosessuali<sup>96,97</sup>.

### **Radioterapia e chemioterapia**

L'uso della radioterapia per il trattamento del carcinoma vulvare non è stata impiegata per la cura delle lesioni primarie, perché la regione vulvare è scarsamente tollerante verso la radioterapia. L'epidermide vulvare è sottile, delicata, molto sensibile e riccamente vascolarizzata. La radioterapia in quest'area frequentemente causa reazioni acute e tardive come fastidio e dolore, vulviti con desquamazioni umide e secche, può causare perdite urinarie o diarrea dovuta ad escoriazioni ed infiammazione della mucosa;

inoltre il rischio dello sviluppo di una necrosi dermica, associate alle complicanze tardive (edema e fibrosi sottocutanea, stenosi, e la tipica teleangectasia che causa il colorito rosso “a fiamma” della zona trattata), limita l’uso sia della radioterapia esterna che della brachiterapia. Il problema principale è che non è stata definita una strategia ottimale per l’uso della radioterapia nel carcinoma vulvare. Questo perché la letteratura consiste in un limitato numero di articoli, diluiti in un lungo periodo durante il quale le tecniche e gli equipaggiamenti radioterapici si sono evoluti. Attualmente, per limitare il più possibile gli effetti collaterali, il range di utilizzo di una terapia radiante esterna, varia dai 45-55 Gy, con un valore medio per seduta che non deve superare 1,8 Gy. Questa serie di controindicazioni ha escluso l’uso della sola radioterapia come trattamento delle lesioni primarie nella maggioranza delle pazienti con un tumore operabile; tuttavia resta un’alternativa utile nel trattamento del carcinoma vulvare, ed anzi negli ultimi tempi sta assumendo un’importanza notevole <sup>77,82</sup>.

La radioterapia sembra indicata per le seguenti situazioni:

- Pre-chirurgica: come terapia neoadiuvante, nelle pazienti con lesioni allo stadio avanzato, al fine di ridurre le dimensioni del tumore e rendere l’intervento più conservativo.
- Post-chirurgica: nel trattamento dei linfonodi pelvici ed inguinali, in pazienti con più di 2 micrometastasi linfonodali, o con una macrometastasi oppure con estensione extracapsulare.

- Post-chirurgica: per prevenire lo sviluppo di recidive ed aumentare la sopravvivenza, in quelle pazienti in cui i margini liberi di sicurezza non siano sufficienti (superiori ad 1cm).
- Come trattamento primario nelle pazienti che presentino piccoli tumori coinvolgenti il clitoride e la zona periclitoidale. Si esegue principalmente nelle donne giovani o che la resezione del clitoride potrebbe creare delle gravi conseguenze psicologiche <sup>84</sup>.

Alcuni autori hanno aggiunto all' utilizzo della radioterapia esterna convenzionale, anche la brachiterapia interstiziale od intracavitaria. Questa tecnica si basa sull' impiego di isotopi radioattivi posti a contatto con la superficie del tessuto interessato, mediante un procedimento invasivo. Sull' utilizzo di questa tecnica vi sono ancora molte incertezze, poiché vi è il pericolo di dare una dose locale di radiazioni troppo elevata ed in un tempo relativamente breve, aumentando ancora di più il rischio di sviluppare vulviti, necrosi ed altre complicanze.

Nel trattamento del carcinoma vulvare, l' impiego della chemioterapia si sta sperimentando solamente da poco tempo, per via dell' età generalmente avanzata, delle condizioni fisiche (la funzionalità renale deve essere buona) e della morbidità di questo gruppo di pazienti. Attualmente questa metodica è impiegata nel trattamento degli stadi avanzati, come terapia neoadiuvante ed in associazione con la radioterapia, oppure da sola come terapia palliativa. La chemio-radioterapia preoperatoria riduce in circa il

60% dei casi l'estensione del tumore primitivo e in percentuale minore l'interessamento linfonodale e permette nei casi responsivi, di ridurre la demolizione. I dati riportati in letteratura dimostrano una buona risposta immediata alla chemio-radioterapia con diversi schemi e dosaggi (Mitomicina C, 5-Fluorouracile, Platino derivati sono gli agenti chemioterapici più usati) in particolare se associata a radioterapia alle dosi di 35-50 Gy. Nelle forme più avanzate in cui vi sia l'ipotesi di un intervento ultraradicale è opportuna la chemio-radioterapia preoperatoria, poiché essa non preclude la successiva terapia chirurgica con il vantaggio di ridurre l'estensione e migliorare la sopravvivenza<sup>90,95,97</sup>.

### **LE RECIDIVE**

La recidiva è definita come una nuova manifestazione di una localizzazione tumorale dopo trattamento con intento curativo, ed un periodo minimo di 6 mesi di intervallo libero dalla malattia. Si possono suddividere in recidive locali, loco-regionali, inguinali, a distanza e multiple.

I fattori prognostici per lo sviluppo di recidive sono lo stadio del tumore primario, presenza di invasione linfonodale, profondità di invasione stromale e coinvolgimento vascolare<sup>98</sup>. Inoltre anche il grading (le lesioni ben differenziate sembrano avere una prognosi migliore), i margini liberi e, secondo alcuni autori, anche l'intervallo libero ed il peso della paziente al momento dell'

intervento chirurgico<sup>99</sup> posso essere dei fattori prognostici. La presenza di metastasi linfonodali è un fattore predittivo per lo sviluppo di recidive multiple e/o a distanza.

Le recidive più frequenti si sviluppano localmente nella zona perineale, mentre la frequenza decresce rispettivamente per le localizzazioni inguinali ed a distanza. Abbastanza frequentemente una paziente può sviluppare recidive multiple.

La maggioranza delle recidive si sviluppa nei primi due anni dall' intervento <sup>77,100</sup>. Anche se alcuni autori hanno evidenziato, viceversa, come non vi sia una diminuzione dell' incidenza delle recidive negli anni successivi<sup>101</sup>.

### **IL FOLLOW-UP**

Dopo un trattamento primario di un carcinoma vulvare, si deve seguire un periodo di follow-up. Lo scopo principale è individuare e trattare il più precocemente possibile lo sviluppo di eventuali recidive locali o linfonodali, per poter aumentare la sopravvivenza e diminuire la morbidità. Inoltre altri possibili benefici derivanti dal follow-up sono di rassicurare e di sostenere psicologicamente la paziente, individuare e curare eventuali complicanze derivanti dal trattamento e non ultimo di raccogliere dati statistici<sup>2</sup>.

Per confermare la presenza di una recidiva è fondamentale l' accertamento istologico. Per questo qualsiasi reperto di natura sospetta deve essere accertato con una biopsia. Se riscontrate e

trattate precocemente, le recidive locali non determinano un abbassamento della sopravvivenza media, invece la presenza di recidive inguinali o a distanza determinano una prognosi sfavorevole. Nei primi 2 anni dopo il trattamento, si osservano la maggioranza delle recidive (40-60%) soprattutto locali, nella zona perineale<sup>85</sup>. Per questo sono necessari controlli serrati ogni 3-6 mesi per i primi 2 anni, e bisogna prestare attenzione ad ogni eventuale disturbo o presenza di un reperto clinico locale. Lo sviluppo di edemi agli arti inferiori fa sospettare una disseminazione metastatica linfonodale. Oltre alla visita di controllo ambulatoriale, altri esami di routine come la radiografia al torace, l'ecografia addominale, la TAC, la RMN e la scintigrafia, anche se permettono una diagnosi precoce dello sviluppo di recidive a distanza, non migliorano le possibilità terapeutiche delle recidive a distanza.

Dopo il secondo anno trattamento e per i successivi 2-3 anni, gli esami di controllo possono essere eseguiti con scadenza semestrale; dopo tale periodo il controllo può essere annuale.

La prognosi varia con la localizzazione della recidiva. La possibilità di trattamento è ristretto alle sole recidive perinali, mediante intervento chirurgico, e limitatamente alle recidive pelviche mediante trattamenti radioterapici e chemioradioterapici<sup>102</sup>. Solitamente le recidive a distanza coinvolgono polmone, linfonodi ed ossa; si sviluppano precocemente e hanno prognosi infausta.

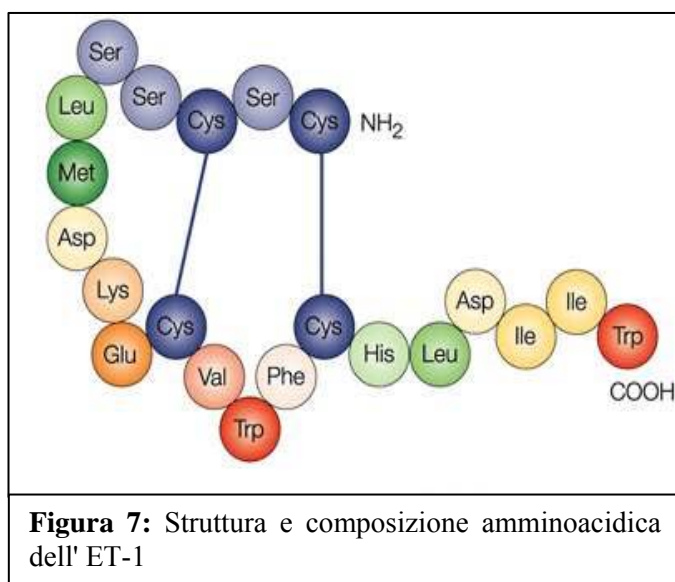




## 2 OBIETTIVI DELLO STUDIO

Numerosi markers sono stati testati nell' intento di predire quale sarà lo sviluppo prognostico e quali pazienti richiedano un trattamento maggiormente aggressivo nell' intento di prevenire un precoce sviluppo di recidive e di contenere la progressione tumorale.

Recentemente nella biologia tumorale è stato rilevato l' importante ruolo svolto dell' Endotelina-1 (ET-1) ed i suoi recettori



Endotelina-A (ET<sub>A</sub>R)

ed Endotelina-B

(ET<sub>B</sub>R), comunemente

denominati Endothelin

axis.

L' Endotelina-1

appartiene ad una

famiglia di tre piccoli

peptidi multifunzionali (21 amminoacidi), le endoteline (ET-1, ET-2,

ET-3), originariamente isolate nel 1988 dall' endotelio di cellule

porcine <sup>103</sup>. Le ET-1 ed ET-2 sono strutturalmente simili (figura 7),

mentre l' ET-3 differisce nella composizione di 6 dei 21

amminoacidi. ET-1 è maggiormente espressa dalle cellule

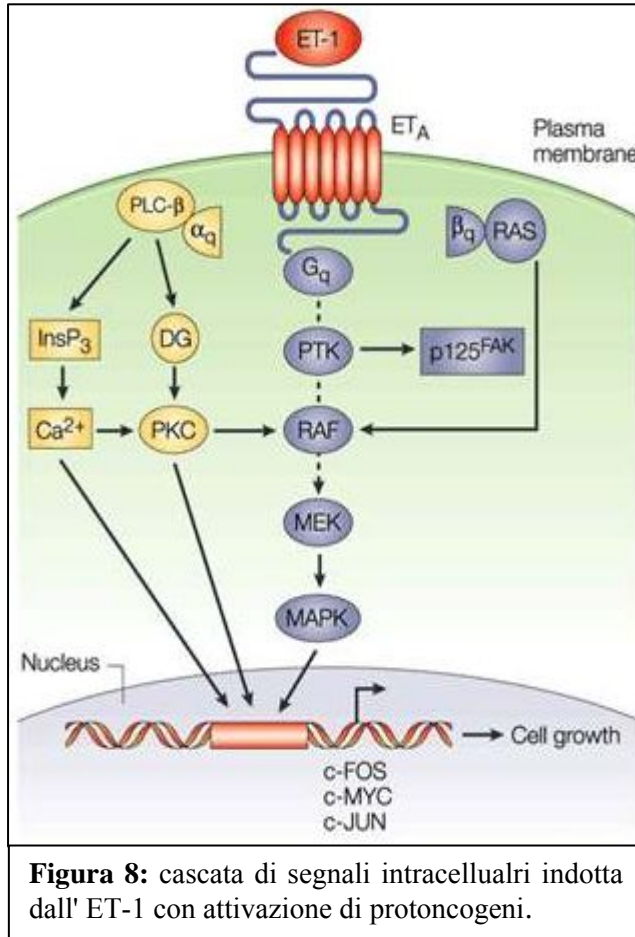
endoteliali, l' ET-2 dalle cellule renali e l' ET-3 soprattutto dalle

cellule gliali. Le endoteline si legano a dei recettori transmembrana

specifici (  $ET_A$  R ed  $ET_B$  R ) accoppiati con le proteine G.  $ET_A$  R è selettivo per ET-1 ed ET-2 mentre  $ET_B$  R è equamente sensibile per le tre isoforme.

All' inizio il ruolo dell' ET-1 fu studiato per l' effetto vasocostrittore;

antagonisti selettivi ( $ET_A$ R) e non selettivi ( $ET_A$ R ed  $ET_B$ R) dei recettori sono in via di sperimentazione per il trattamento dell' ipertensione, dello scompenso cardiaco e dell' insufficienza renale. In aggiunta al ruolo centrale di mediatore dell' ipertensione e dell' insufficienza renale,

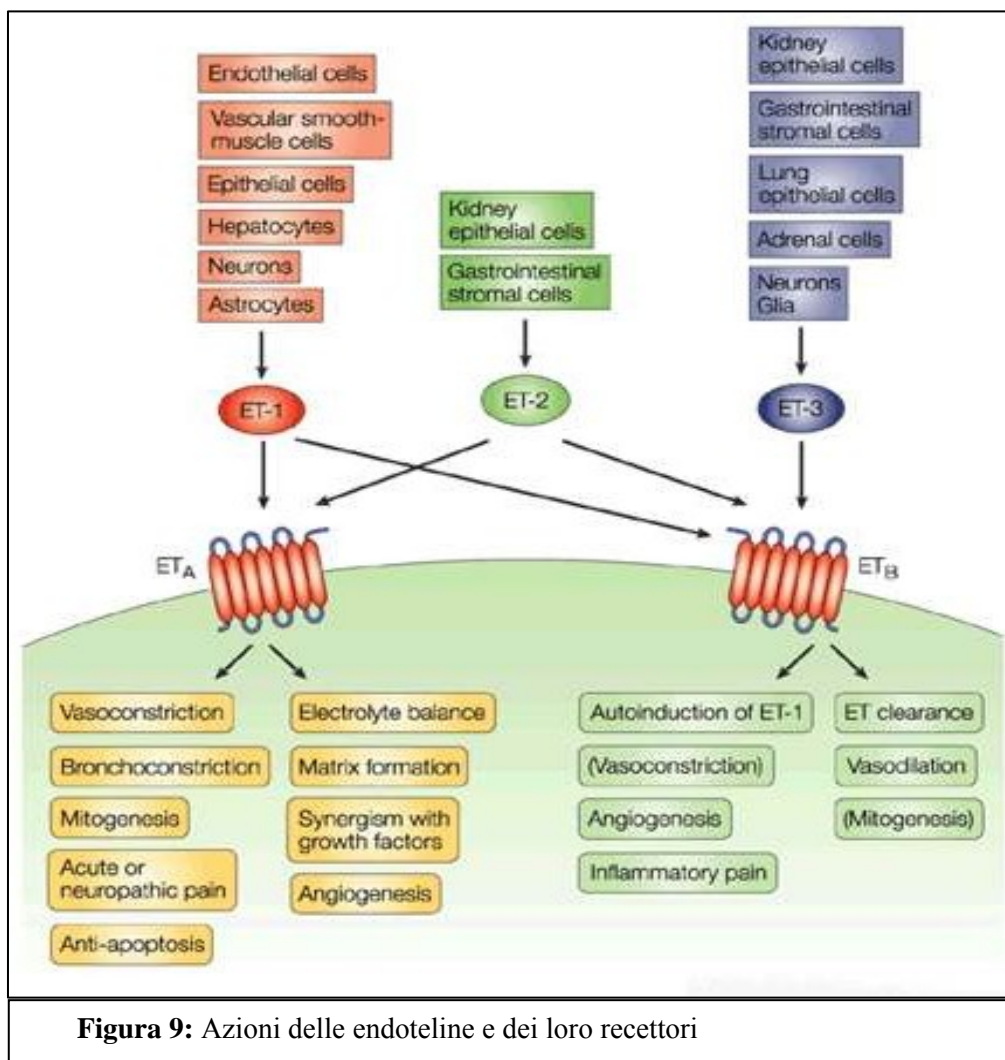


recentemente l' ET-1 si è rivelato essere un fattore determinante per la crescita e lo sviluppo tumorale. Infatti l' attivazione dei recettori ET specifici, sembra attivare tutta una serie di meccanismi che indirizzano lo sviluppo neoplastico come: la proliferazione cellulare, inibizione dell' apoptosi, angiogenesi, osteogenesi ed attivazione degli osteoblasti con rimodellamento della matrice ossea, nell' invasione tumorale e nello sviluppo delle

metastasi e sembra essere implicato anche nella patogenesi e nella mediazione del dolore<sup>104,105</sup>.

L' ET-1 interviene nella regolazione della proliferazione cellulare e nell' apoptosi attraverso vari meccanismi. L' ET-1 attiva varie protein kinasi che a loro volta sono coinvolte nella trasduzione del segnale e nella regolazione di vari fattori proliferativi compresi i più noti EGF (epidermal grow factor), PKC (protein chinasi C), insulin like grow factor-1 e MAPK (mitogen activated protein kinase); inoltre produce una rapida induzione dei geni c-FOS, c-JUN e c-MYC (figura 8). Questa cascata di segnali determina un' alterata vasocostrizione, trasduzione del segnale mitogenetico e proliferazione cellulare. L' ET-1 non solo causa proliferazione cellulare ma inibisce l' apoptosi delle cellule tumorali. Sia la sopravvivenza cellulare che la proliferazione sono mediati da ET<sub>A</sub>R recettori posti sulla superficie cellulare di fibroblasti, cellule muscolari lisce e cellule epiteliali; e mediante ET<sub>B</sub>R posti sulla superficie delle cellule endoteliali <sup>106,107,108</sup>. Altro ruolo importante dell' ET axis è l' angiogenesi. Varie strategie per la neovascolarizzazione, sono modulate dall' ET-1, come la proliferazione delle cellule endoteliali mediata da ET<sub>B</sub>R, migrazione, invasione e produzione di proteasi. Il tessuto muscolare liscio e la proliferazione e la migrazione di periciti sono sotto la stimolazione del ET<sub>A</sub>R. Il medesimo recettore è coinvolto nella produzione del VEGF (vascular endothelial grow factor), un fattore essenziale per

la crescita tumorale e l'angiogenesi, che a sua volta induce la proliferazione delle cellule endoteliali ed aumenta la permeabilità vasale aumentando i livelli di dell' HIF-1 $\alpha$  (hipoxia-inducible factor-1 $\alpha$ )<sup>109,110</sup>. Un' aumento di espressione di ET-1 è stata associata ad un' attivazione di metalloproteasi (MMPs e uPA), che hanno un' importante funzione nel rimodellamento tissutale e nelle espansioni metastatiche, degradando la matrice extracellulare<sup>92</sup>. . Tutte queste azioni sono riassunte nella figura 9.



L'espressione ed il ruolo dell' endothelin axis è stato oggetto di

studio per differenti tipologie di tumori (tabella IX), come il carcinoma prostatico, del polmone, della mammella, del colon, renale, ed in ambito ginecologico il carcinoma della cervice e dell'ovaio.

Tabella IX: Ruolo dell' ET axis in alcuni differenti tumori

<b>Tipo di tumore</b>	<b>Azione dell' ET-1</b>	<b>Recettori dell' ET</b>	<b>Antagonisti recettoriali e loro effetti</b>
<b>Prostata</b>	ET-1 promuove la crescita tumorale, ET <sub>A</sub> R inibisce l' apoptosi	Alta espressione di ET <sub>A</sub> R. Ridotta od assente espressione di ET <sub>B</sub> R, Frequente metilazione del gene ET <sub>B</sub> R	Atrasentan allevia il dolore, e ritarda lo sviluppo della progressione clinica e biochimica della malattia
<b>Ovaio</b>	ET-1 promuove la proliferazione e la sopravvivenza cellulare. ET <sub>A</sub> R stimola l' invasione tumorale e l' angiogenesi VEGF dipendente	ET <sub>A</sub> R mRNA si riscontra nell' 84% dei carcinomi esaminati, ET <sub>B</sub> R solo nel 40%. ET <sub>A</sub> R media tutti gli effetti inducenti la neoplasia prodotti da ET-1.	Atrasentan inibisce la proliferazione cellulare e la crescita del carcinoma ovarico (in xenograft) ed in combinazione con taxanes mostra degli effetti additivi
<b>Melanoma</b>	ET-1 ed ET-3 promuovono la proliferazione cellulare e l' invasione.	ET <sub>A</sub> R è ipoespresso nelle cellule di melanoma. ET <sub>B</sub> R invece è aumentato	Gli antagonisti di ET <sub>B</sub> R inibiscono la crescita nelle linee cellulari di melanoma e riducono il melanoma umano nei gatti nudi.
<b>Ossa</b>	ET-1 aumenta l' espressione di osteocalcina e la neoformazione di tessuto osseo.	Sia ET <sub>A</sub> R che ET <sub>B</sub> R sono espressi.	Gli antagonisti di ET <sub>A</sub> R bloccano gli effetti mediati di ET-1 ed inoltre inibiscono la progressione delle metastasi osse nel carcinoma prostatico
<b>Renale</b>	ET-1 è fattore di resistenza all' apoptosi indotta da paclitaxel nelle linee cellulari di carcinoma renale	Tutte le linee cellulari esprimono ET <sub>A</sub> R	
<b>Mammella</b>	L'aumento dell'espressione di ET-1 è inversamente correlata con il grado di differenziazione delle cellule tumorali, aumento di ET <sub>A</sub> R è correlato con resistenza alla chemioterapia	Elevate espressioni di ET <sub>A</sub> R sono state trovate nel carcinoma della mammella	

<b>Tipo di tumore</b>	<b>Azione dell' ET-1</b>	<b>Recettori dell' ET</b>	<b>Antagonisti recettoriali e loro effetti</b>
<b>Renale</b>	ET-1 è fattore di resistenza all' apoptosi indotta da paclitaxel nelle linee cellulari di carcinoma renale	Tutte le linee cellulari esprimono ET <sub>A</sub> R	
<b>Polmone</b>	ET-1 è stato identificato in molti squamous cell ed adenocarcinomi	Sia ET <sub>A</sub> R che ET <sub>B</sub> R sono espressi; ET <sub>A</sub> R è downregulated rapportato al tessuto bronchiale normale	
<b>Colon</b>	ET-1 è fattore di resistenza nell' apoptosi indotta da FasL nelle linee cellulari del colon carcinoma	Elevata espressione di ET <sub>A</sub> R e ET <sub>B</sub> R nel tessuto neoplastico	Antagonisti ET <sub>A/B</sub> R, inibiscono la proliferazione cellulare e potenziano l' apoptosi indotta da FasL.
<b>Cervice</b>	ET-1 induce proliferazione nelle linee cellulari di carcinomi HPV positivi	Espressi entrambi i recettori. Aumento di ET <sub>A</sub> R con HPV-positivi	Atrasentan inibisce la proliferazione cellulare e la crescita del carcinoma cervicale e dimostra avere un' effetto additivo in combinazione con texane.
<b>Kaposi's</b>	ET-1 and ET-3 inducono proliferazione migrazione ed invasione.	Entrambi i recettori sono espressi.	Antagonisti di ET <sub>A,B</sub> R bloccano la proliferazione e l' invasione indotta da ET-1 ed inibisce la crescita tumorale nei gatti nudi.
<b>SNC tumori</b>	ET-1 promuove la proliferazione cellulare del meningioma	Entrambi i recettori sono espressi.	BQ123 blocca gli effetti indotti da ET-1; gli antagonisti di ET <sub>A</sub> R non hanno effetti.

Nelson *et al.*<sup>111</sup> fu il primo a dimostrare come l' espressione dell' ET-1 potesse essere un fattore importante nella progressione delle neoplasie prostatiche avanzate e di come ET axis potesse essere un target terapeutico. Attualmente si è giunti alla fase II di uno studio clinico con Atrasentan (ABT-627) un antagonista selettivo per il ET<sub>A</sub>R, che ha prodotto buoni risultati nel trattamento dei pazienti affetti da carcinoma prostatico ormone refrattario<sup>112</sup>.

Buoni risultati sono stati ottenuti anche nei tumori ginecologici, Bagnato *et al.*<sup>113</sup> riportarono un' innalzamento significativo dei livelli di espressione di ET-1 mRNA nel carcinoma ovarico, rispetto ai tessuti normali. Un trattamento con Atrasentan riduce la crescita del tumore nei modelli tumorali su topi xenografts. Nel carcinoma della mammella i lavori presentati da Wülfing, Kersting *et al.* <sup>114</sup> dimostrano come una iperespressione dell' ET Axis sia tipica nei tumori più aggressivi, con un' alta vascolarizzazione ed espressione di VEGF, che presentano una prognosi peggiore. Sempre dai lavori presentati da Wülfing *et al.* si è notato come un' innalzamento del livello di espressione per ET<sub>A</sub>R, è risultato essere predittivo per un resistenza alla chemioterapia; questo indica come la determinazione del ET<sub>A</sub>R possa essere un marker utile per identificare le pazienti poco responsive alla normale chemioterapia<sup>115</sup>.

Studi recenti sono stati eseguiti anche nel carcinoma invasivo della vescica, ed hanno confermato come un sovra espressione dell' ET



axis abbia un ruolo nella carcinogenesi di questa neoplasia; i primi dati su questo studio riportano una predominante sovra espressione di ET<sub>B</sub>R nei tumori della vescica a prognosi migliore<sup>116,117</sup>. È stato eseguito anche uno studio sul carcinoma squamo-cellulare dell' esofago, nel quale alte espressioni di colorazione dell' ET axis è stato correlato con l' invasione linfonodale e con lo sviluppo di metastasi<sup>118</sup>.

Attualmente non ci sono dati riportati in letteratura, di nostra conoscenza, sul ruolo dell' ET axis nello sviluppo del carcinoma invasivo della vulva. L' obiettivo di questo studio è di analizzare il livello di espressione dell' ET axis mediante tecnica immunohistochimica eseguita su supporto ricavato con la tecnica del tissue microarray e di verificare se i valori di espressione di ET-1 e dei suoi recettori ET<sub>A</sub>R ed ET<sub>B</sub>R abbiano un valore prognostico per il carcinoma invasivo squamo-cellulare della vulva.



### **3 MATERIALI E METODI**

Questo studio, iniziato nell' ottobre del 2003, è stato eseguito presso l' ospedale universitario di Münster in collaborazione con il dipartimento di Ginecologia ed Ostetricia ed il dipartimento di Patologia dell' Università di Münster (Germania).

All' inizio si è creato un registro di tutte le pazienti trattate per carcinoma vulvare dal gennaio 1988 al dicembre 2004.

I criteri di inclusione dello studio erano:

- Carcinoma squamocellulare invasivo della vulva istologicamente documentato
- L' analisi istologica ed il trattamento del tumore primario dovevano essere stati eseguiti presso il dipartimento di Patologia ed il dipartimento di Ginecologia dell' ospedale Universitario di Münster.
- Dovevano essere ancora conservati presso il dipartimento di Patologia i vetrini istologici ed il corrispondente materiale fissato su blocchi di paraffina. Questo doveva trovarsi in buone condizioni di conservazione ed in quantità sufficiente.

Il lavoro di raccolta dei dati e del materiale è suddiviso in 5 distinte sezioni:

La prima è la recluta dei casi e raccolta dei corrispettivi dati clinici e di follow-up; la seconda è la parte prettamente anatomo-patologica, con la ricerca, per ciascun paziente, del corrispondente

materiale fissato su blocco di paraffina ed esecuzione di nuove sezioni al microtomo necessarie per la terza fase che consiste nel costruire il blocco del tissue microarray (TMA) mediante il prelevamento di campioni di materiale neoplastico da ciascun blocco. Nella quarta parte vengono eseguite delle sezioni al microtomo di 4  $\mu\text{m}$ , dal blocco del microarray, ed adagiate su di un supporto solido di vetro. Questi vetrini saranno poi sottoposti ad analisi immunohistochimica, con valutazione semiquantitativa del livello di espressione della colorazione. L'ultima parte è l'analisi statistica per valutare la correlazione e la significatività tra i dati clinici ed i risultati immunohistochimici ottenuti.

### **Reclutamento dei casi e raccolta dei dati clinici e di follow-up**

Per creare il database all'inizio si è stilata una lista delle pazienti operate alla regione vulvare in un arco di tempo che va dal 1988 al 2004, partendo dai referti operatori conservati nell'archivio del dipartimento di Ginecologia. Questo periodo è stato imposto dalle capacità dell'archivio materiale del dipartimento di Patologia, archivio che contiene tutti i referti, i vetrini ed il materiale fissato in blocchi di paraffina dal 1988 ad oggi. Questa lista di pazienti è stata poi confrontata con i referti patologici conservati nel database e nell'archivio del dipartimento di Patologia, per escludere tutti i casi che non fossero carcinomi invasivi della vulva. Ottenuta una nuova lista di pazienti, presso l'archivio centrale si è

iniziato il lavoro di analisi degli atti clinici di ogni paziente selezionata. Questo lavoro fu necessario anzitutto per confermare che la diagnosi ed il primo trattamento chirurgico fosse stato eseguito presso l'ospedale di Münster. Vennero rilevati sia tutti i dati anatomico-patologici, come stadiazione TNM, grading istologico, presenza e numero di metastasi linfonodali od a distanza, HPV positiva, che tutte le informazioni cliniche come tipo di intervento chirurgico, se sottoposta a radioterapia od altro, storia di precedenti o successive neoplasie sia ginecologiche che in altri distretti. Altri dati vennero ricavati dall'analisi del follow-up come: progressione della malattia, sviluppo di recidive locali o linfonodali, sviluppo e sede di eventuali metastasi, ed il successivo trattamento, sopravvivenza totale, intervallo libero da malattia, causa di morte. Abbiamo analizzato i dati del follow-up, ponendo come termine il 1/12/2004. Questi dati necessari per la valutazione statistica vennero raccolti su di un database informatico mediante foglio di lavoro Microsoft® Excel.

### **Ricerca e valutazione del materiale patologico**

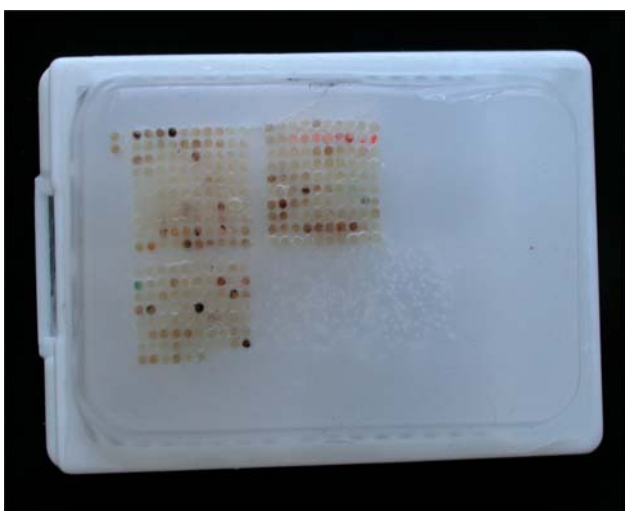
Dalla cartella clinica e dai referti patologici si ottenne per ogni paziente due numeri identificativi, uno del referto patologico diagnostico dopo biopsia ed uno dopo trattamento chirurgico (dove previsto). Il medesimo numero identificativo serviva per recuperare i vetrini istologici conservati nell'archivio centrale del dipartimento

di Patologia. Per ogni paziente sono stati riesaminati tutti i vetrini istologici della diagnosi, selezionandone minimo due di quelli maggiormente rappresentativi della neoplasia. Il vetrino con la sezione di materiale necessaria per l'indagine istologica è identificato dal numero del referto patologico e da un numero progressivo che si base sul numero delle sezioni di materiale disposte. Successivamente si è risaliti dal vetrino al blocco corrispondente (conservato nell'archivio del dipartimento di Patologia) contenete il materiale imbibito e conservato in paraffina. Una volta raccolti tutti i blocchi di materiale ed ordinata la lista delle pazienti secondo la data della diagnosi, si rese necessario eseguire delle nuove sezioni al microtomo su dei nuovi vetrini per lo studio istologico mediante ematossilina-eosina, per poter circoscrivere ed evidenziare i contorni del tumore presente nel materiale fissato nel blocco di paraffina.

A questo punto il numero dei casi si è di 69 pazienti, questo perché alcuni casi sono stati esclusi per difficoltà nel reperire il materiale, che poteva essere stato esaurito da altri studi precedenti, o mandato ad altre università per altri studi, oppure per il deperimento di alcuni blocchi nei quali non è stato possibile eseguire una sezione corretta.

## Costruzione del tissue microarray (TMA)

Generalmente per ogni paziente sono stati scelti 1-2 blocchi di



**Figura 10** : Il blocco con il microarray tissutale

materiale fissato in paraffina proveniente dal tumore primario. Per ogni caso sono stati estratti 4 prelievi cilindrici di 0,6mm di diametro di materiale neoplastico (core), 2 dalla zona

centrale della neoplasia e 2 dalla zona invasiva. Questi prelievi sono stati successivamente inseriti tramite un microarrayer tissutale manuale (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA) in un nuovo blocco di paraffina delle dimensioni di 20 x 35mm. Il set finale del microarray tissutale (figura 10) consisteva in 1 blocco contenente 276 campioni neoplastici rappresentativo dei 69 casi riportati.

La presenza o meno della neoplasia in ogni campione presente nel microarray è stato verificata dopo aver eseguito una sezione del blocco del microarray colorata con ematossilina-eosina (figura 12). Per rientrare nello studio condizione necessaria era che la neoplasia fosse ben rappresentata in almeno uno dei quattro campionamenti eseguiti per ogni caso. Per questo motivo, 1 caso è stato escluso, ed numero utile è sceso da 69 a 68.

Eseguire un'indagine immunohistochimica su diversi campioni di tessuto utilizzando la tecnica del tissue microarray ha molteplici vantaggi. Tutti i campioni provenienti dai tessuti neoplastici dei casi selezionati sono disposti in un'unico supporto solido (vetrino); ciò richiede un'unico passaggio di colorazione per ogni singolo marker rispetto alle molteplici colorazioni che sarebbero necessarie analizzando tutti i casi vetrino per vetrino, riducendo anche il margine di errore. Viene facilitata l'analisi semiquantitativa e l'attribuzione di uno score alle varie espressioni di colorazione, poiché tutti i campionamenti sono disposti nel medesimo vetrino ed un confronto è facilitato. Inoltre viene aumentata esponenzialmente la possibilità di investigare per molteplici markers, visto che da un blocco di tissue microarray sono ricavabili molteplici vetrini (figura 11). Inoltre viene risparmiato una notevole quantità di materiale fissato in paraffina.

### **Analisi immunohistochimica**

Dal blocco del microarray si eseguirono delle sezioni di 4µm montate poi su di un vetrino rivestito da un supporto di poli-L-lisina. Ogni sezione è stata deparaffinizzata e reidratata in una serie graduata di alcool.

La colorazione immunohistochimica per ET<sub>A</sub>R ed ET<sub>B</sub>R è stata eseguita utilizzando una procedura multisteps semiautomatica (DAKO-Autostainer; DAKO Diagnostics, Hamburg, Germany). Gli



anticorpi usati sono due anticorpi policlonali di pecora per ET<sub>A</sub>R ed ET<sub>B</sub>R (ET<sub>A</sub>-Receptor Antiserum, Product No. 210-570-C250; ET<sub>B</sub>-Receptor Antiserum, Product No. 210-506-C250, Affinity Bioreagents, Golden, CO, USA) applicati ad una diluizione di 1:100 per 30 min. L' anticorpo primario anti-ET<sub>A</sub> si accumula contro il peptide C-terminale dell' ET<sub>A</sub>-recettore di ratto, mentre l' Ab anti-ET<sub>B</sub> contro l' amminoacido 13 del peptide C-terminale dell' ET<sub>B</sub>-recettore di ratto.

Per la colorazione ET-1 è stato usato un' anticorpo monoclonale di topo (Anti-Endothelin-1 Mab, Clone TR.ET.48.5, Affinity Bioreagents, Golden, GO, USA) che si lega ad un epitopo nella regione rappresentata dagli amminoacidi 8-16. La deparaffinizzazione dei tessuti è stata seguita da un pretrattamento con un vaporizzatore (Multi-Gourmet-Steamer, BRAUN, Type 3216) per antigeni di riparazione (citrate buffer pH 6.0 per 35 min.) Dopo aver bloccato la perossidasi endogena, l' anticorpo primario è stato applicato ad una diluizione di 1:500 per 25 min seguita da una incubazione per un secondo anticorpo (Link-HRP) per 20 min.

Dopo i primi anticorpi, i vetrini con le sezioni del microarray tissutale, sono state incubate con anticorpi anti-pecora di ratto (DAKO) usando il secondo anticorpo ad una diluizione di 1:500 per 25 min. Dopo aver bloccato la perossidasi endogena (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per 10 min) ed incubato con Evison Detection Kit per 25 min, la reazione enzimatica è stata sviluppata con Chromogen-DAB (2 x 5 min). Alla

fine le specie istologiche sono state controcolorate con emattossilina e montate con glicina di Kaiser. Come controlli positivi sono stati usati il tessuto prostatico per l' ET<sub>A</sub>R e tessuto di muscolo liscio come controllo positivo dell' ET<sub>B</sub>R; l' omissione di anticorpi primari serve come controllo negativo.

Un' analisi semiquantitativa delle colorazioni risultanti dai 276 campionamenti (core) del microarray tissutale è stata eseguita da due degli autori (E. Eltze, M. Bertolin), uno dei quali è un patologo con esperienza certificata (E.Eltze). Entrambi non erano a conoscenza dei dati istopatologici e clinici dei casi, durante la valutazione. L' intensità della colorazione di ET-1, ET<sub>A</sub>R e ET<sub>B</sub>R rilevata ad una valutazione al microscopio, è stata arbitrariamente suddivisa in una scala di 4 gradazioni (0= negativo, no espressione; 1= scarsamente espressa, 2=moderatamente espressa 3= altamente espressione) (figura 14).

L' analisi immunoistochimica per Ki-67 è stata eseguita utilizzando una sezione di 4µm del blocco di TMA, preventivamente deparaffinizzata e reidratata. Successivamente la sezione fu avviata ad una procedura multisteps automatica (DAKO-Autostainer; DAKO Diagnostics, Hamburg, Germany), dopo pretrattamento con vaporizzatore della sezione disposta su supporto solido di vetro (Multi-Gourmet-Steamer, BRAUN, Type 3216) per antigeni di riparazione (30 min.) Anticorpi monoclonali di topo anti-Ki-67 (clone MIB-1; DAKO Diagnostica, Hamburg, anti-human ki-67

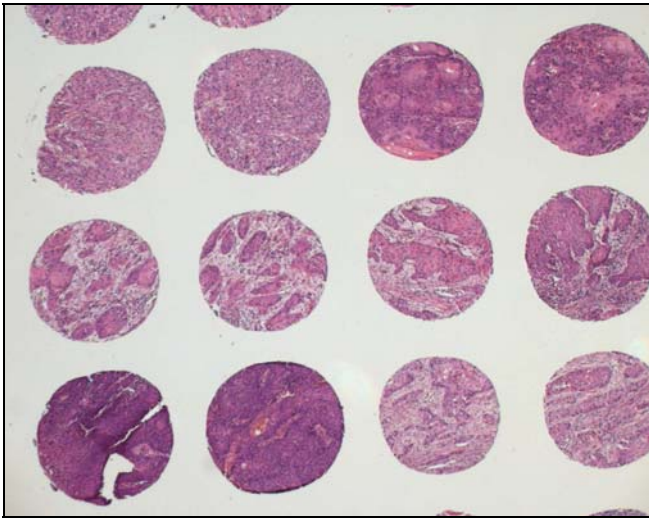
Antigen, Code No. M7240) sono stati usati come anticorpi primari, ad una diluizione di 1:1000. Successivamente è stata eseguita un'analisi semiquantitativa al microscopio ottico eseguita dai medesimi autori, senza conoscere i risultati clinico patologici dei campioni analizzati. Arbitrariamente è stata assegnata una stima percentuale dei nuclei colorati (rossi i nuclei positivi, blu quelli negativi) sul totale dei nuclei presenti per ciascun campionamento (figura 13).

### **Analisi statistica**

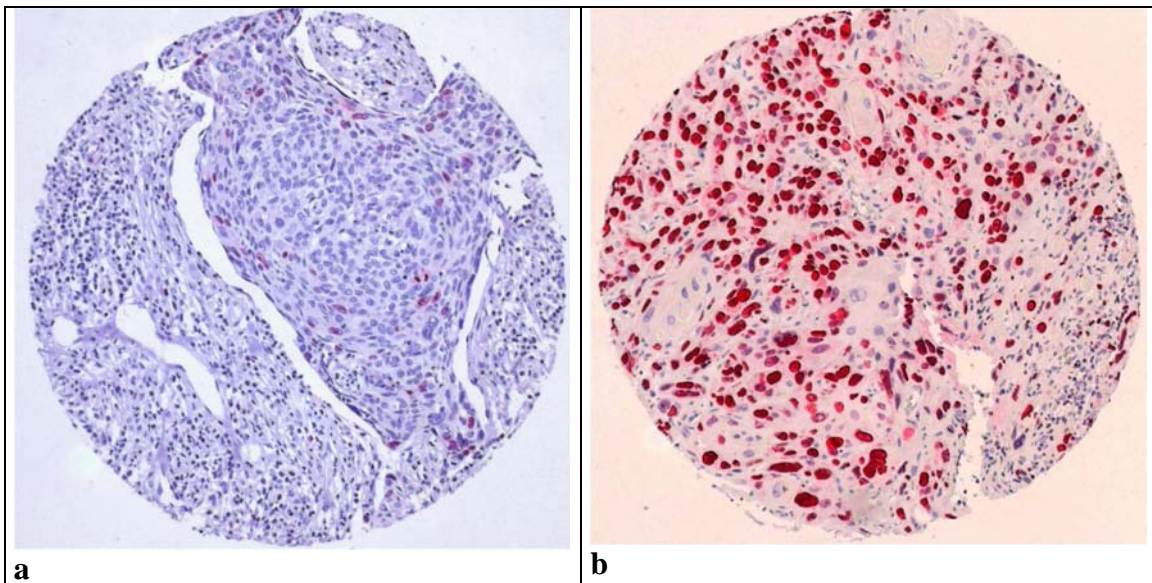
L'analisi statistica è stata eseguita con il software statistico SPSS 11.0.1© (SPSS Inc., USA). Tutti i parametri clinici e patologici sono stati correlati con i risultati ottenuti dall'analisi immunohistochimica, attraverso una serie contingente di tabelle ed il test Chi-quadrato. La sopravvivenza totale e l'intervallo libero da malattia sono state stimate utilizzando il metodo introdotto da Kaplan e Maier <sup>119</sup>. Le curve di sopravvivenza sono state comparate con il log-rank test <sup>120</sup>.



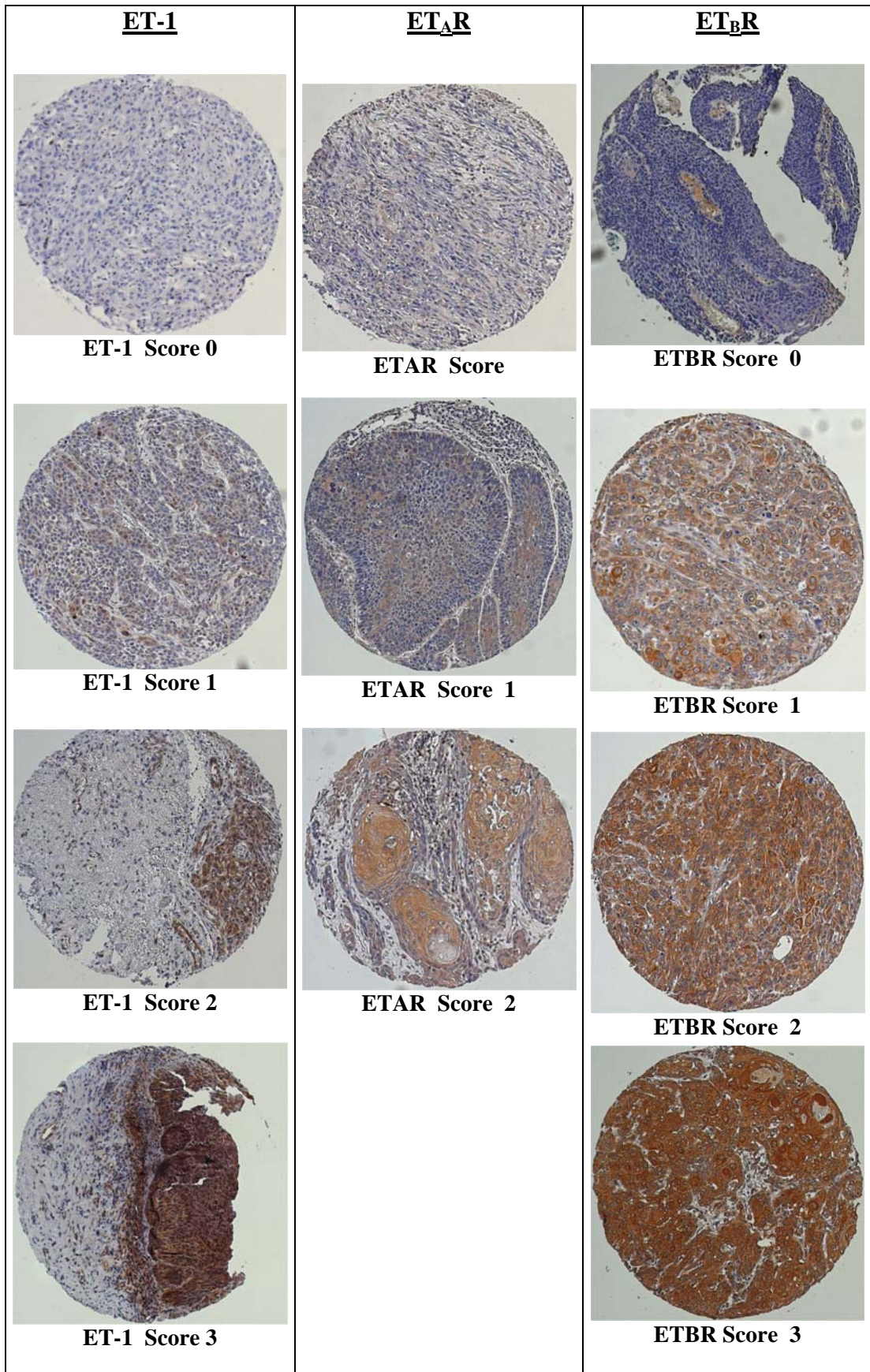
**Figura 11:** Vetrino con sezione del blocco di tissue microarray con analisi di ETBR



**Figura 12:** Colorazione con ematossilina-eosina per la valutazione della presenza di cellule tumorali nei campioni



**Figura 13:** Espressione di Ki-67 (MIB-1) negativo (a) e positivo (b)



**Figura 14:** Livelli di espressione (score 0-3) delle colorazioni immunohistochemiche per ET-1 e suoi recettori ETAR ed ETBR



## 4 RISULTATI

### **Valutazione dei dati clinici**

In questo studio sono state valutate 68 pazienti con carcinoma vulvare primariamente diagnosticato e trattato presso il dipartimento di Ginecologia ed Ostetricia dell' Università di Münster (Germania). I dati diagnostici principali riguardanti le pazienti sono riassunti nella tabella seguente (tabella X).

**Tabella X:** Dati clinico-patologici principali alla diagnosi

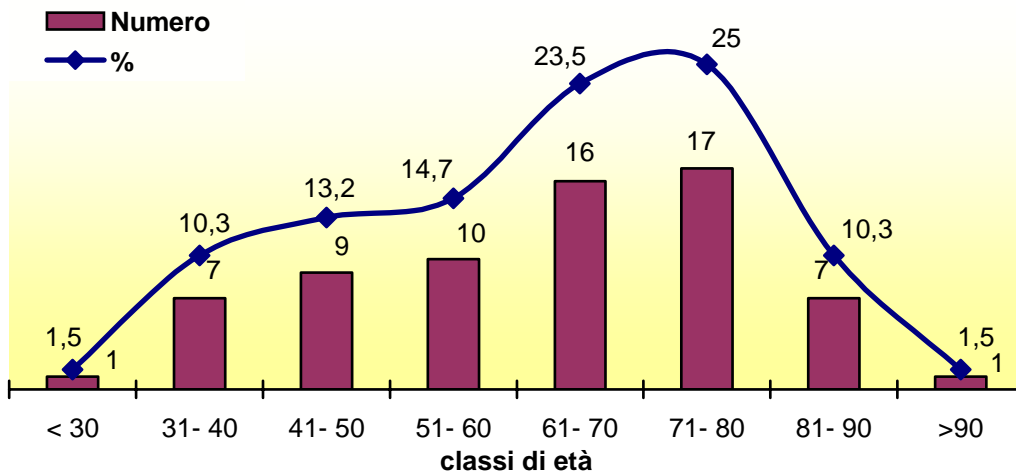
<b><u>Dati alla diagnosi</u></b>	<b>No</b>	<b>%</b>
<b>Età (anni)</b>		
< 50	16	23,5
50-70	27	39,7
>70	25	36,8
<b>pT</b>		
T1a	4	5,9
T1b	18	26,5
T2	32	47,0
T3	12	17,6
T4	2	2,9
<b>N</b>		
0	26	38,2
1	18	26,5
2	10	14,7
3	2	2,9
X	12	17,6
<b>M</b>		
0	42	61,8
1	8	11,8
X	18	26,5

<b>Stadio FIGO</b>		
Ia	4	5,9
Ib	16	23,5
II	16	23,5
III	20	29,4
IVa	9	13,2
IVb	3	4,4
<b>Grading</b>		
1	8	11,7
2	44	64,7
3	16	23,5
<b>HPV status</b>		
HPV +	31	45,6
HPV -	19	27,9
X	18	26,5
<b>Linfoadenectomia</b>	56	82,4
<b>Radioterapia</b>	31	45,6
<b>Radio + chemioterapia</b>	2	2,9

Dai risultati riportati in tabella il campione presenta un'età media è di 63 anni (range 26-93), e vi è una distribuzione maggiore con età superiore ai 50 anni (52 pazienti pari al 76,5%), mentre i casi con età inferiore ai 50 anni sono 16 (23,5%).



### Distribuzione per età



**Figura 15:** Distribuzione per età dei pazienti

Valutando per il TNM vediamo che la frequenza maggiore si ha per tumori in stadio T2 (32 casi pari al 47,0%). Alla diagnosi 30 casi (44,1%) sono con linfonodi positivi, ed i rimanenti 38 casi sono con linfonodi negativi o non valutati. In 8 casi (11,8%) vi è la presenza di metastasi (la valutazione delle metastasi in 1 caso è stata patologica, mentre nei rimanenti si basa sull'evidenza clinica).

Il grado istologico più frequente si è dimostrato essere il grading di tipo 2, (moderatamente differenziato) presente in 44 casi (64,7%).

Lo stadio FIGO III è il più rappresentato, con 20 casi pari al 29,4%.

Nel campione analizzato 31 pazienti (45,6%) sono risultate HPV positive alla diagnosi. Correlando questo dato clinico con le varie fasce d'età si è visto che le pazienti di età inferiore ai 50 anni, sono 9 su un totale di 16 (56,3%); per la fascia compresa tra i 50 ed i 70 anni sono 11 su 27 (40,7%); mentre per pazienti con età superiore

ai 70 anni sono 11 su 25 (44,0%).

Tutte le pazienti sono state sottoposte a trattamento chirurgico adeguato allo stadio della neoplasia. La linfadenectomia è stata praticata in 56 casi (82,4%). La radioterapia è stata eseguita in 31 pazienti (45,6%) mentre 2 pazienti (2,9%) sono state sottoposte al trattamento combinato radio-chemioterapico.

I dati principali riferiti al follow-up di tutti i 68 casi, sono elencati nella tabella XI. Le percentuali della colonna dei No sono riferite al totale dei 68 casi, mentre nelle altre colonne le percentuali sono in riferimento al dato della riga corrispondente.

**Tabella XI:** Dati raccolti durante il follow-up

<b>Dati sul follow-up</b>	<b>No (%)</b>	<b>Vive senza malattia (%)</b>	<b>Vive con malattia (%)</b>	<b>Decedute per neoplasia (%)</b>	<b>Decedute non da neoplasia (%)</b>	<b>Follow-up non completo (%)</b>
<b>Totale</b>	68 (100)	21	9	20 (29,4)	4/(5,9)	14/ (20,6)
<b>Ripresa evolutiva</b>	29 (42,6)	0	9 (31,0)	17 (58,6)	1/(3,4)	2/(6,9)
Ripresa evolutiva con N+	18 (62,1)	0	4 (22,2)	13 (72,2)	0	1 (5,6)
Ripresa evolutiva con N-	11 (37,9)	0	5 (45,6)	4 (36,4)	1 (9,1)	1 (9,1)
<b>Recidiva locale</b>	22 (32,4)	0	7 (31,8)	13 (59,1)	1 (4,6)	1 (4,6)
1 rec	16 (72,7)	0	6 (37,5)	9 (56,3)	0	1 (6,3)
2 rec	4 (18,2)	0	0	3 (75,0)	1 (25,0)	0
3 rec	1 (4,5)	0	0	1	0	0
4 rec	1 (4,5)	0	1	0	0	0
<b>Casi senza recidiva locale</b>	46 (67,6)	21( 45,6)	2 (4,4)	6 (13,0)	4 (8,7)	13 (28,3)
<b>Recidiva loco-regionale</b>	28 (41,2)	0	12( 42,9)	13 (46,4)	3 (10,7)	0
<b>Recidive a distanza</b>	10 (14,7)	0	0	10 (100)	0	0
Recidive a distanza multiple	6 (60,0))	0	0	6 (100)	0	0

Nel periodo di follow-up considerato (terminato il 1/12/2004), 30 pazienti su 68 (44,1%) sono ancora vive, mentre 20 (29,4%) sono decedute a causa della neoplasia e 4 sono decedute per altre cause. Vi sono stati 14 casi (20,6%) considerati incompleti, in cui

non è stato possibile reperire le informazioni del follow-up fino al termine proposto.

La recidiva ripresa evolutiva della malattia (che indicata tutti quei casi che dopo il primo trattamento, sono stati sottoposti ad un successivo intervento chirurgico per sviluppo di una recidiva o per progressione della malattia) si è verificata in 29 casi (42,6%), di cui 17 (58,6%) successivamente decedute per neoplasia; 18 casi (55,2%) hanno presentato un coinvolgimento linfonodale.

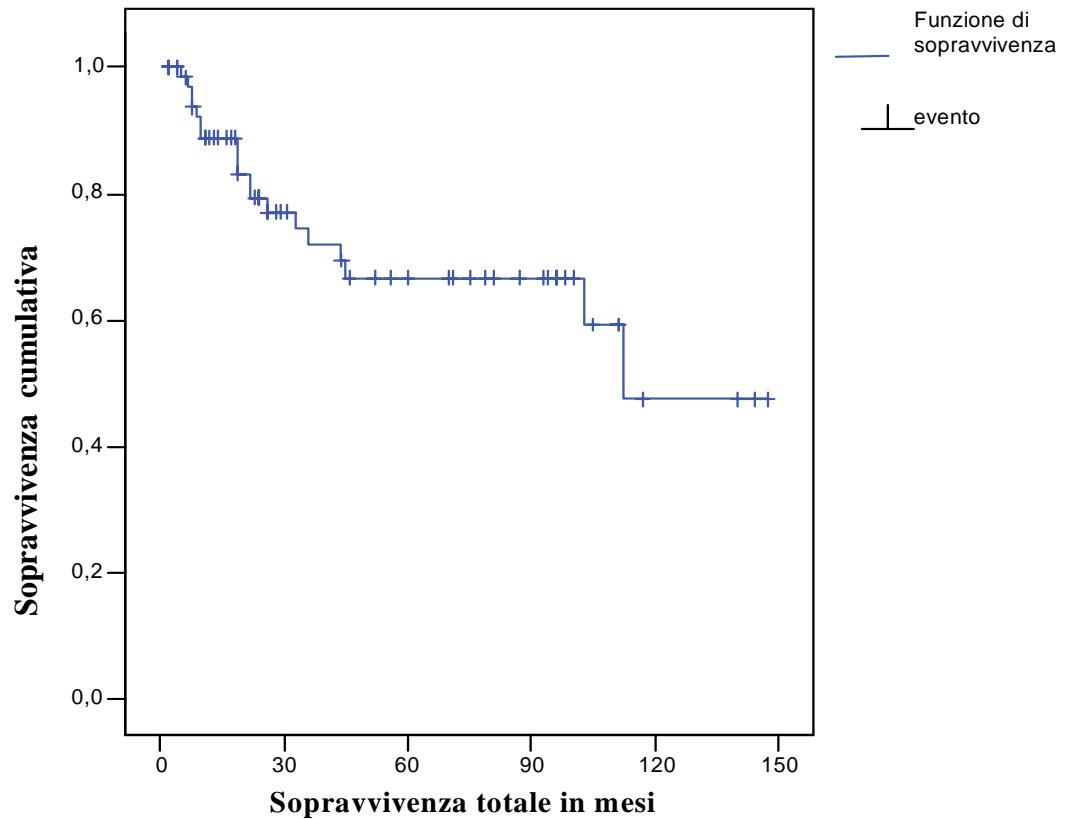
La recidiva locale si è manifestata in 22 pazienti (32,4%), la maggior parte delle quali ha sviluppato una sola recidiva (16 casi su 22, pari al 72,7%).

In 28 casi (41,2%) si sono sviluppate delle recidive loco-regionali, ed in 10 casi (14,7%) delle recidive a distanza di cui 6 (60,0%) multiple.

La valutazione della sopravvivenza totale e dell'intervallo libero da malattia sono gli altri dati fondamentali ricavati dal follow-up (l'intervallo libero da malattia è il tempo intercorrente tra il primo intervento chirurgico ed il trattamento di un successivo avanzamento della malattia).

La funzione di sopravvivenza è descritta nella figura 16 nella quale si può notare la curva di decadimento della sopravvivenza totale. Il 75 % delle pazienti presenta una sopravvivenza a tre anni ed il 65% a cinque anni.

### Funzione di sopravvivenza



**Figura 16:** Curva di funzione della sopravvivenza del campione secondo Kaplan Meyer.

Valutando l' intervallo libero di malattia (in mesi dall' intervento primario) nelle le pazienti che successivamente hanno presentato una ripresa evolutiva della malattia (29 casi), notiamo che ha una media di 39,5 mesi, ma andando ad analizzare la distribuzione notiamo come la maggioranza delle recidive si sviluppi nei primi 18 mesi dall' intervento (19 casi, 65,6%) (tabella. XII).

**Tabella XII:** Distribuzione del tempo di insorgenza della recidiva

<b>Intervallo libero da malattia</b> in mesi	<b>Pazienti con recidiva</b> No / %
Media 39,5 mesi	29 / 100
< 6 mesi	8 / 27,6
6- 12 mesi	6 / 20,7
12- 18 mesi	5 / 17,2
18- 24 mesi	2 / 6,9
24- 36 mesi	3 / 10,3
36- 48 mesi	1 / 3,5
48- 60 mesi	1 / 3,5
> 60 mesi	3 / 10,3

### **Valutazione dei risultati immunoistochimici**

Dai 69 casi selezionati per il microarray, si sono ottenuti 276 campionamenti di tessuto neoplastico. La valutazione dell' ET-1 è stata giudicata attendibile in 237 campioni (85,9%) , lo stesso numero (237 prelevamenti pari a 85,9%) risulta anche nell' analisi per l' ET<sub>A</sub>R, 235 (85,1%) per ET<sub>B</sub>R, mentre alla valutazione per Ki-67 ci sono 233 campioni su 276 (84,4%). Questo è dovuto al fatto che in alcuni prelievi non erano rappresentate abbastanza cellule tumorali, oppure alcuni campionamenti sono andati persi o danneggiati durante la fase di preparazione o di colorazione del vetrino.

I valori relativi all'analisi semiquantitativa dell' espressione dell' ET-1 e dei suoi recettori ET<sub>A</sub>R ed ET<sub>B</sub>R nel totale dei casi sono espressi nella tabella seguente (tabella XIII)

**Tabella XIII:** Espressione di ET-1, ET<sub>A</sub>R, ET<sub>B</sub>R.

<b>ET Axis</b> No / %	<b>SCORE di espressione</b>			
	<b>0</b> <b>(assente)</b>	<b>1</b> <b>(scarsa)</b>	<b>2</b> <b>(moderata)</b>	<b>3</b> <b>(alta)</b>
<b>ET-1</b>	23 (33,8%)	37 (54,4%)	7 (10,3%)	1 (1,5%)
<b>ET<sub>A</sub>R</b>	5 (7,4%)	53 (77,9%)	10 (14,7%)	0
<b>ET<sub>B</sub>R</b>	4 (5,9%)	34 (50,0%)	26 (38,2%)	4 (5,9%)

Come si può notare l' espressione di ET-1 è positiva in 45 casi su 68 (66,2%), mentre per ET<sub>A</sub>R è di 63 casi (92,6%) e di 64 casi (94,1%) per ET<sub>B</sub>R. Possiamo suddividere l' espressione dell' ET axis in due gruppi, quelli a bassa intensità di colorazione (gruppo con espressione 0-1) ed ad alta intensità (gruppo 2-3). In questo caso notiamo che l' 88,2% dei casi aveva una bassa espressione di ET-1 (score 0-1), allo stesso modo l' espressione di ET<sub>A</sub>R presenta l' 85,3% dei casi con score compreso tra 0-1. La distribuzione del ET<sub>B</sub>R risulta più omogenea, con un 55,9 per score bassi (0-1) ed un 44,1 con espressione alta (score 2-3).

All' espressione del MIB-1 (Ki-67), è stata data una valutazione percentuale dei nuclei colorati sul totale dei nuclei presenti nel campione. I dati sono riportati nella tabella sottostante (tabella XIV).

**Tabella XIV:** Range di espressione del Ki-67 in percentuali, con numero di pazienti associati.

<b>Range della percentuale dei nuclei positivi</b>	<b>Numero di pazienti / % sul totale</b>
5-10%	17 / 25,0
15-20%	15 / 22,1
25-30%	12 / 17,6
35-40%	6 / 8,8
45-50%	6 / 8,8
55-60%	6 / 8,8
65-70%	1 / 1,5
75-80%	5 / 7,4
Totale:	68 / 100

L'analisi ha evidenziato che la maggioranza dei casi (32, pari al 47,1%) ha una bassa espressione per KI-67 (range 5-10% e 15-20%).

### **Correlazioni statistiche con i parametri clinico-patologici**

Abbiamo eseguito una correlazione tra le espressioni di ET-1, ET<sub>AR</sub>, ET<sub>BR</sub> e tutte le variabili clinico-patologiche delle pazienti selezionate con carcinoma invasivo della vulva. Inoltre sono state eseguite correlazioni tra le variabili clinico-patologiche ed ET-1 a bassa espressione (0-1) verso ET-1 ad alta espressione (2-3). Sono state riportate le correlazioni per ET<sub>AR</sub> (0-3) ed ET<sub>AR</sub> (score 0-1) vs ET<sub>AR</sub> (score 2-3), ed allo stesso modo anche quelle per ET<sub>BR</sub> (0-3) ed ET<sub>BR</sub> (0-1/2-3). Inoltre sono state valutate le correlazioni tra i vari parametri con le sommatorie di espressione ET<sub>AR</sub>+ET<sub>BR</sub>.

Per ogni correlazione è stata calcolato l'indice di significatività P



( $X^2$  chi quadrato test) come dimostrato in tabella XV.

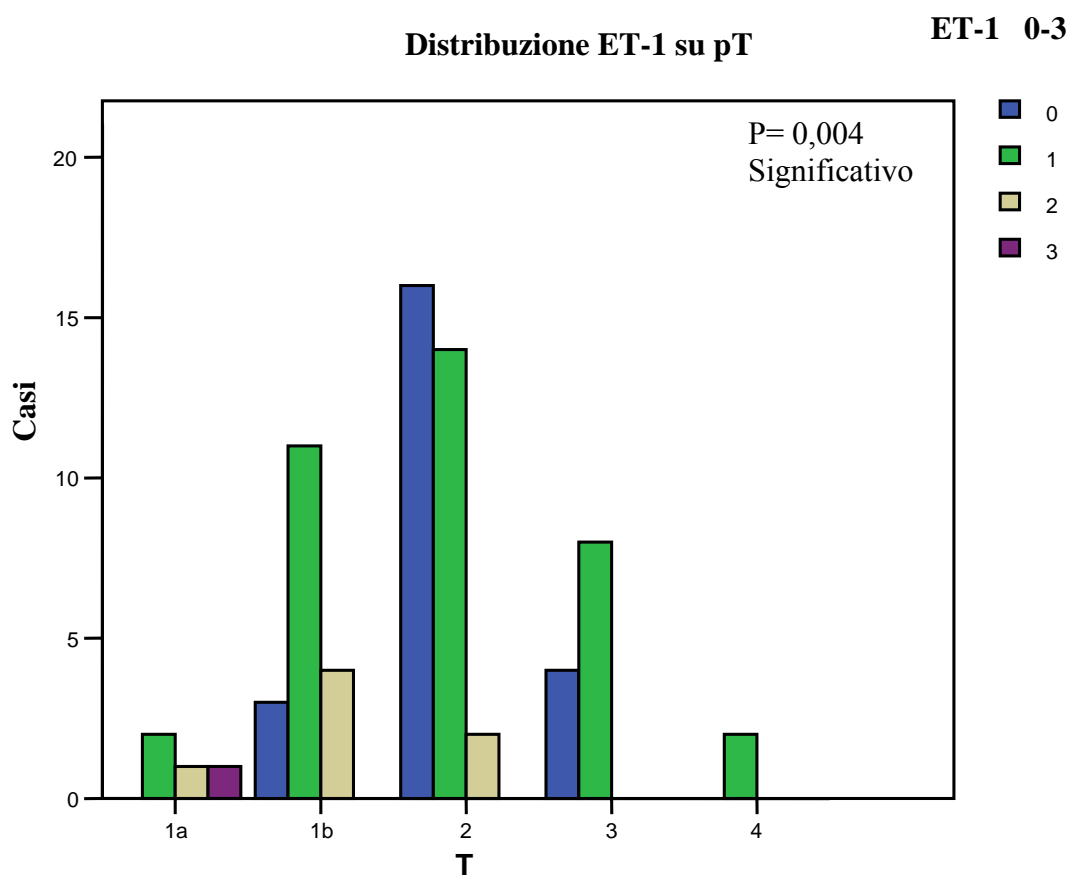
**Tabella XV:** Correlazione tra le variabili clinico-patologiche e l' ET axis espresse in indici di significatività P secondo il  $X^2$  test.

	<b>ET1 0-3</b>	<b>ET1 0-1/2-3</b>	<b>ETAR 0-3</b>	<b>ETAR 0-1/2-3</b>	<b>ETBR 0-3</b>	<b>ETBR 0-1/2-3</b>	<b>ETAR + ETBR</b>
<b>p T</b>	0,004	0,035	0,324	0,795	0,523	0,485	0,124
<b>p N</b>	0,247	0,162	0,387	0,333	0,476	0,834	0,417
<b>N +/-</b>	0,288	0,246	0,824	0,273	0,059	0,707	0,347
<b>PM</b>	0,221	0,065	0,689	0,904	0,938	0,598	0,727
<b>Solo pM si/no</b>	0,171	0,04	0,216	0,794	0,896	0,348	0,473
<b>G</b>	0,48	0,401	0,469	0,412	0,542	0,395	0,177
<b>Progressione</b>	0,701	0,654	0,877	0,611	0,078	0,01	0,022
<b>Libero da recidiva</b>	0,732	0,721	0,911	0,685	0,124	0,019	0,04
<b>Morte</b>	0,462	0,151	0,735	0,735	0,148	0,081	0,326
<b>Survival code</b>	0,426	0,145	0,28	0,411	0,27	0,115	0,299
<b>Recidive locali</b>	0,389	0,417	0,955	0,851	0,922	0,497	0,305
<b>Rec. Locali +/-</b>	0,394	0,256	0,64	0,366	0,591	0,281	0,005
<b>Metastasi</b>	0,576	0,175	0,849	0,655	0,263	0,09	0,381
<b>Radioterapia</b>	0,114	0,353	0,889	0,744	0,733	0,507	0,15
<b>HPV</b>	0,688	0,305	0,947	0,926	0,644	0,397	0,39
	<b>Altamente significativo</b>	<b>Significativo</b>	<b>Trend</b>				

Come si osserva vi è una correlazione molto significativa tra le dimensioni del tumore (pT) con l'espressione di ET-1. (tabella XVI)

**Tabella XVI :** Correlazione tra stadio pT (dimensioni del tumore) ed ET-1

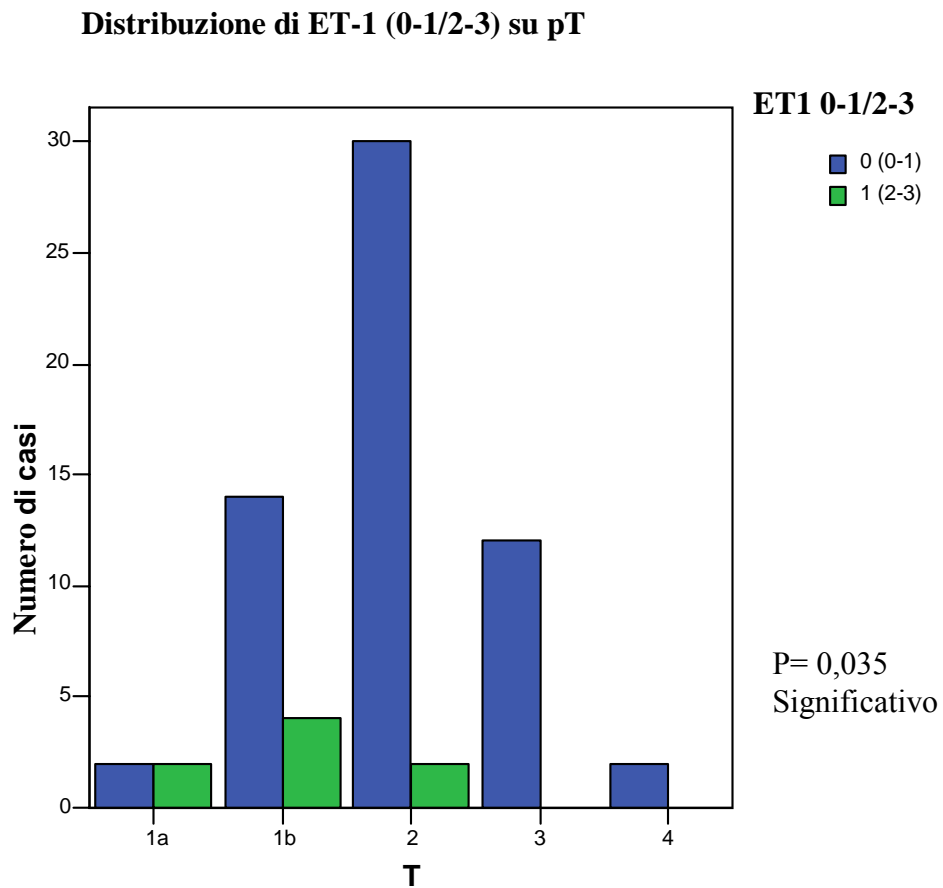
T	ET-1 0-3				Totale / %
	0	1	2	3	
1a	0	2	1	1	4 / 5,8
1b	3	11	4	0	18 / 26,5
2	16	14	2	0	32 / 47,1
3	4	8	0	0	12 / 17,6
4	0	2	0	0	2 / 2,9
Totale	23	37	7	1	68 / 100
<b>Significatività P</b> (X <sup>2</sup> test)					<b>0,004</b>



**Figura 17:** Distribuzione dell' espressione di ET-1 con pT

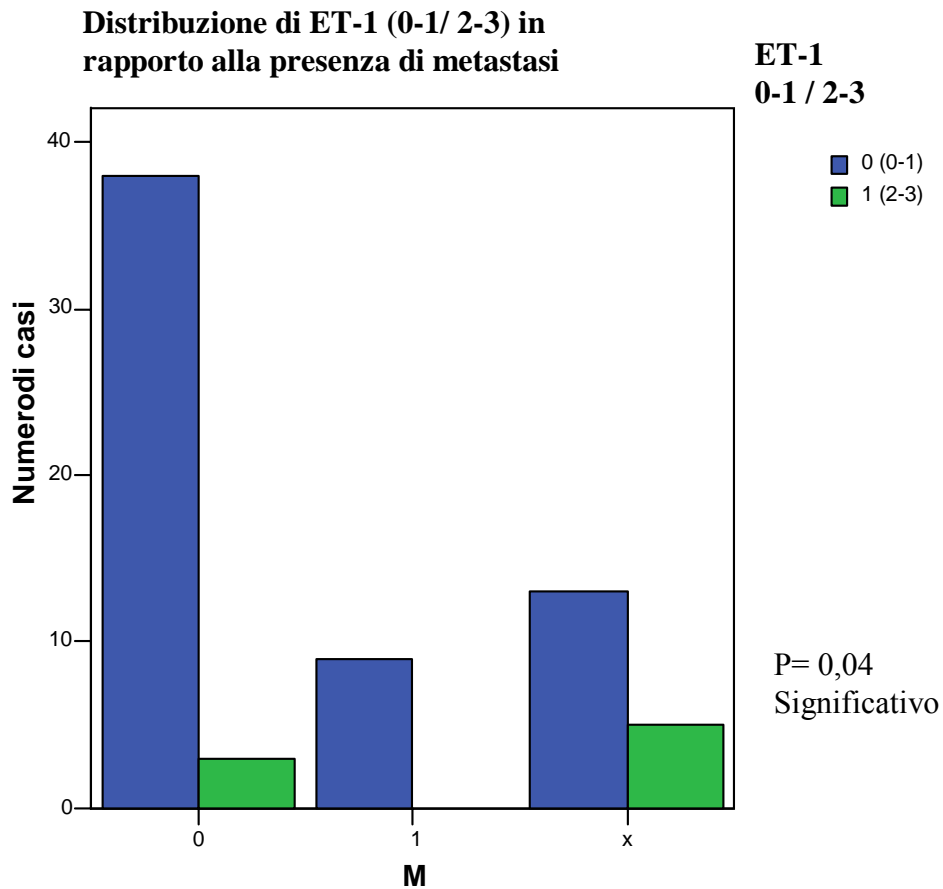
Dal grafico in figura.14 e dalla tabella XVI si vede come vi sia una correlazione molto significativa tra ET-1 ad alta espressione (2-3) con gli stadi precoci T1 e T2 (P=0,004); lo stesso si può notare nella

correlazione tra le due classi di espressione ET-1 (bassa 0-1/ alta 2-3) con lo stadio pT, presentando una significatività  $P=0,035$ .



**Figura 18:** Distribuzione delle due classi di espressione per ET-1 con pT

Il rapporto tra ET-1 a bassa espressione (0-1) ed ET-1 ad alta espressione (2-3) risulta essere un marker significativo ( $P=0,04$ ) per i tumori che presentano metastasi (figura 18).



**Figura 19:** Distribuzione delle due classi di espressione di ET-1 con le metastasi

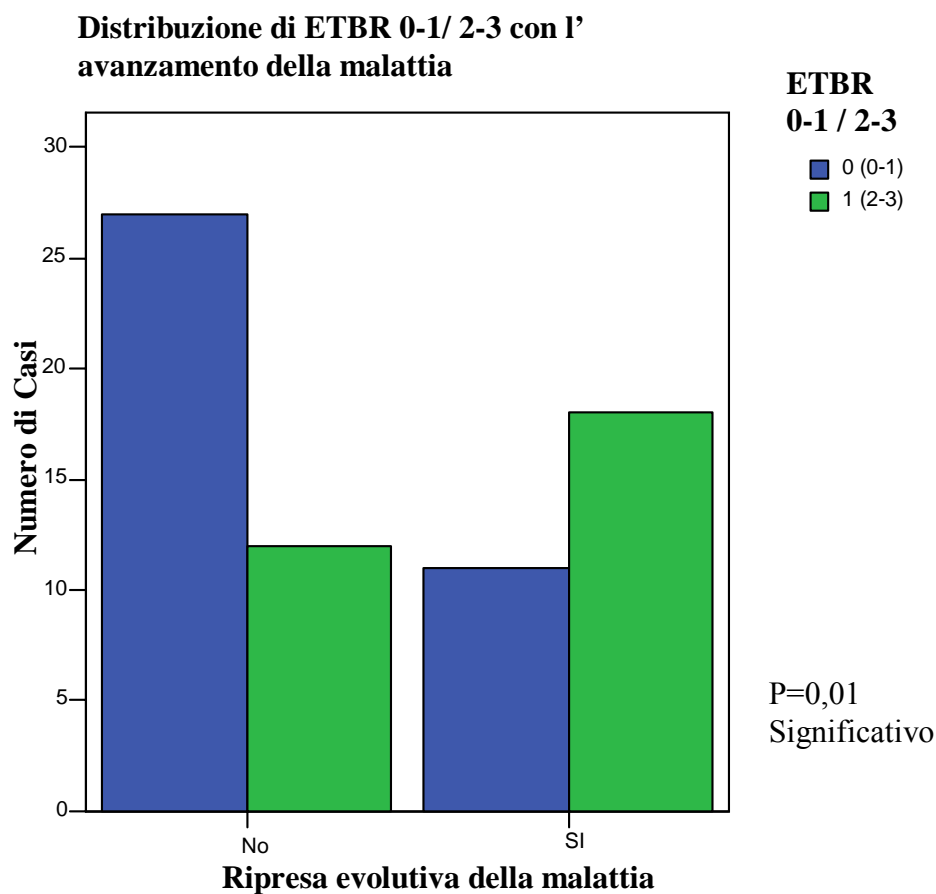
Dal grafico riportato in figura 19 si nota come i casi senza metastasi mostrano la presenza di alta espressione per ET-1 (2-3) ed una prevalenza maggiore di bassa espressione per ET-1 (0-1), mentre all'opposto nei casi con presenza di metastasi non sia presente ET-1 ad alta espressione (2-3). Da questo si nota come l'espressione di ET-1 sia inversamente correlata con la presenza di metastasi.

L'espressione di ET<sub>A</sub>R è stata anch'essa correlata con tutte le variabili clinico-patologiche, ma non ci sono state delle relazioni

significative, come si può vedere dalla tabella XV.

L'espressione di ET<sub>B</sub>R (sia lineare che in rapporto alle due classi di espressione) è correlata in modo significativo con molteplici variabili, come lo sviluppo di una ripresa evolutiva della malattia, l'assenza di sviluppo di recidive e lo sviluppo di metastasi.

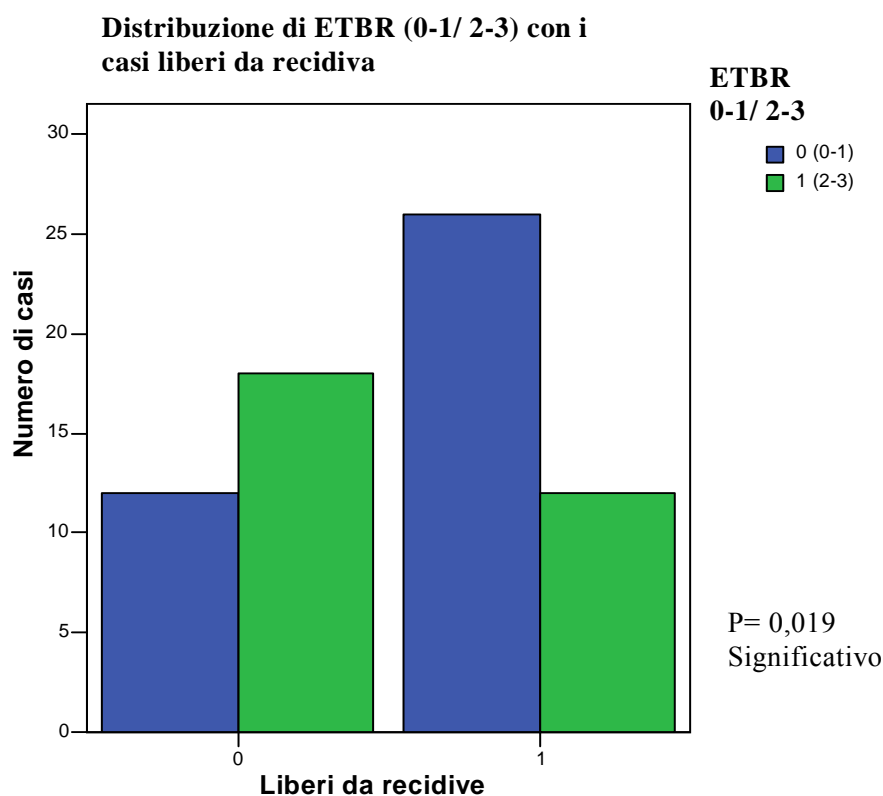
Nonostante la relazione tra l'espressione di ET<sub>B</sub>R (0-3) con l'avanzamento della malattia, presenti un trend con una significatività di  $P=0,078$ , suddividendo l'espressione di ET<sub>B</sub>R in due classi, a bassa (0-1) ed ad alta (2-3) intensità di colorazione, possiamo invece vedere come ci sia una correlazione significativa ( $P=0,01$ ) con l'avanzamento della malattia.



**Figura 20:** Distribuzione delle due classi di espressione per ETBR con l'avanzamento della malattia.

Come si può interpretare dalla figura 20 un' espressione bassa della colorazione (0-1) per l' ET<sub>B</sub>R è correlata più frequentemente associata con un' assenza di una ripresa evolutiva della malattia, viceversa un' espressione alta (2-3) della colorazione per ET<sub>B</sub>R è più frequentemente in relazione con una ripresa evolutiva della malattia.

Correlando le due classi di espressione per ET<sub>B</sub>R con i pazienti liberi da recidive, ottengo i risultati riassunti nel grafico esposto in figura 21.



**Figura 21:** Distribuzione delle due classi di espressione per ETBR in rapporto ai casi liberi da recidive

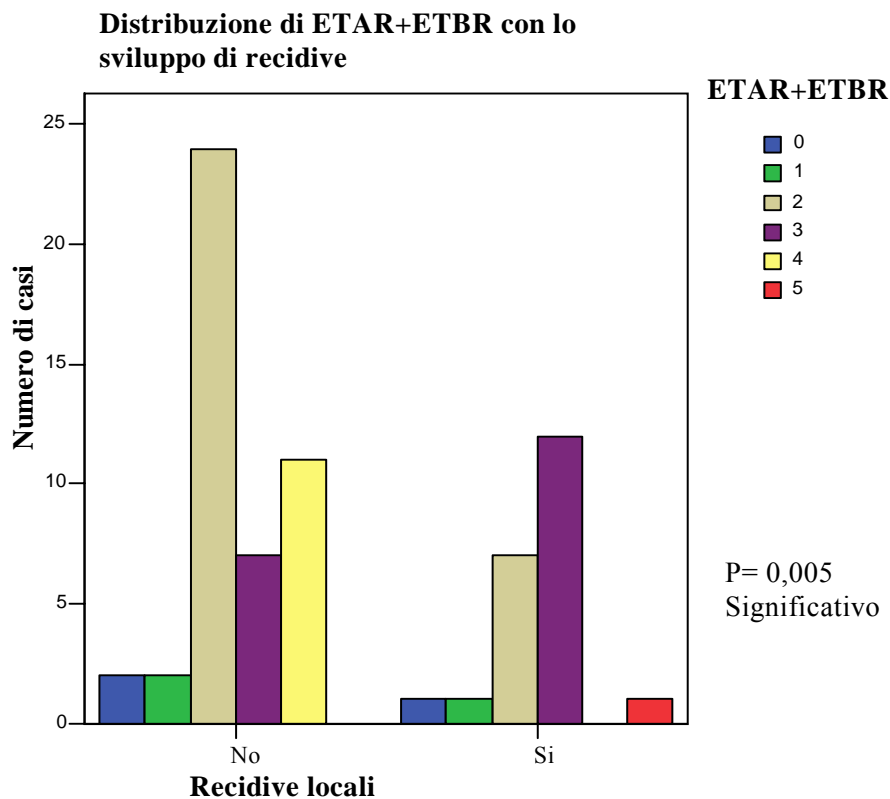
In questo grafico si evidenzia come la classe a bassa espressione di colorazione per ET<sub>B</sub>R (0-1) sia correlata maggiormente ad un' assenza di recidive, mentre un' alta espressione di ET<sub>B</sub>R (2-3) sia prognostica per un successivo sviluppo di recidive. Questa relazione presenta una significatività P=0,019.

Continuando con l' analisi delle variabili riportate in tabella XV, possiamo osservare un trend prognostico di ET<sub>B</sub>R (ETB 0-3) in tumori con invasione linfonodale (P=0,059). L'analisi del rapporto di espressione tra le due classi di ETB (basso ed alto indice di colorazione) risulta avere un trend con lo sviluppo di metastasi (P=0,09) e con la morte della paziente (P=0,081).

L' espressione di ET<sub>AR</sub> da sola non ha dato risultati significativi, ma messa in associazione con i livelli di espressione di ET<sub>BR</sub>, essa non ha alterato i valori ricavati mediante ET<sub>BR</sub> ed ha confermato l' unidirezionalità dei valori prognostici dell' ET axis.

I dati ET<sub>AR</sub>+ET<sub>BR</sub> sono ricavati dalla somma del punteggio rappresentante l' espressione di ET<sub>AR</sub> ed il punteggio di espressione di ET<sub>BR</sub>. Non è rappresentato il punteggio di 6 poiché non ci sono espressioni per ET<sub>AR</sub> pari a 3.

Dalla sommatoria dei valori di ET<sub>AR</sub>+ET<sub>BR</sub> è stata ricavata una relazione molto significativa (P=0,05) con lo sviluppo di recidive locali (figura 22)

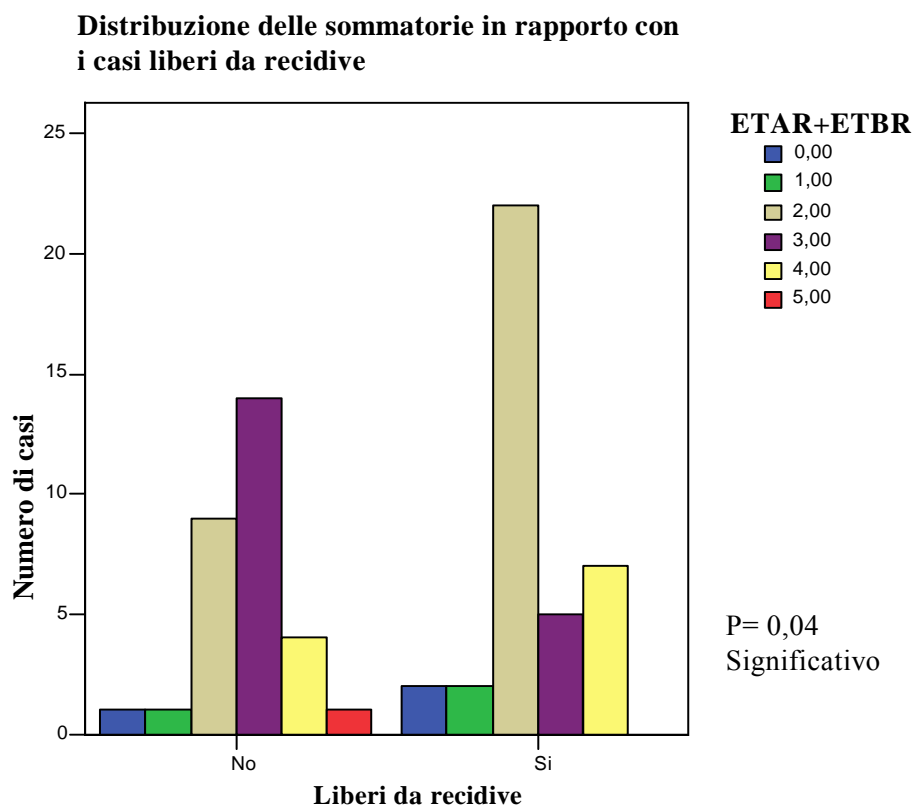


**Figura 22:** Distribuzione delle sommatorie ET<sub>AR</sub>+ET<sub>BR</sub> in rapporto allo sviluppo di recidive locali



Nel grafico in figura 22 è rappresentata la distribuzione dei valori di sommatorie per  $ET_{AR}+ET_{BR}$  nei gruppi positivi o negativi per lo sviluppo di recidive locali. Come si vede nel gruppo delle pazienti che non hanno sviluppato recidive locali c'è una espressione elevata dei valori di sommatoria 2 e 4, ed una espressione maggiore dei valori 0 e 1. Invece nel gruppo che ha presentato una o più recidive notiamo come ci sia una maggiore espressione dei valori 3 e 5 ed un'assenza del valore 4.

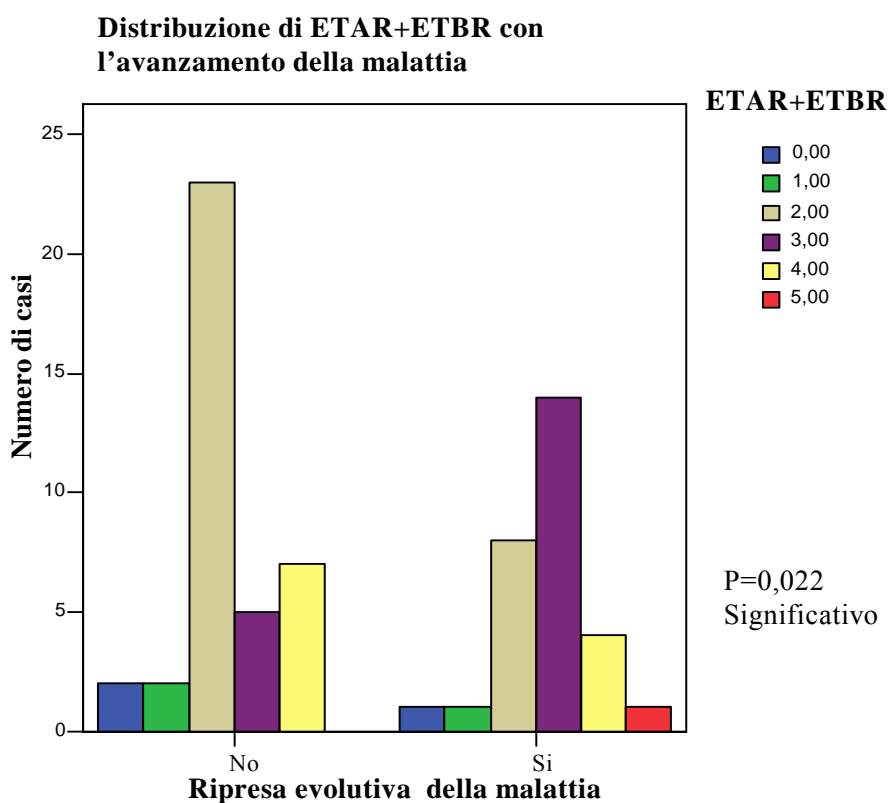
Nel grafico successivo (figura 23) è rappresentata la relazione tra le sommatorie di  $ET_{AR}+ET_{BR}$  con i casi liberi da recidive. Questa relazione ha un significatività  $P= 0,04$ .



**Figura 23:** Distribuzione delle sommatorie in rapporto ai casi liberi da recidive

Dall' analisi della distribuzione delle sommatorie di  $ET_{AR}+ET_{BR}$  rispetto ai pazienti liberi da recidive, si vede che c'è una prevalenza delle basse espressioni (0-2 ma soprattutto il valore 2) predominanti nei pazienti liberi da recidive rispetto ai valori riportati dal gruppo opposto (che rappresenta i casi che non sono liberi da recidive), dove il valore più frequente di espressione è pari a 3. Ambigua rimane l' interpretazione dei valori di sommatorie pari a 4. Il valore pari a 5 è presente solamente nel gruppo non libero da recidiva.

Nel successivo grafico viene messo in relazione ripresa evolutiva della malattia (intesa come il gruppo di pazienti che sono state sottoposte ad un successivo trattamento per sviluppo di recidiva, o per progressione) con la sommatoria di  $ET_{AR}+ET_{BR}$ .(figura 24)



**Figura 24:** Distribuzione delle sommatorie di ETA+ETB con l' avanzamento della malattia

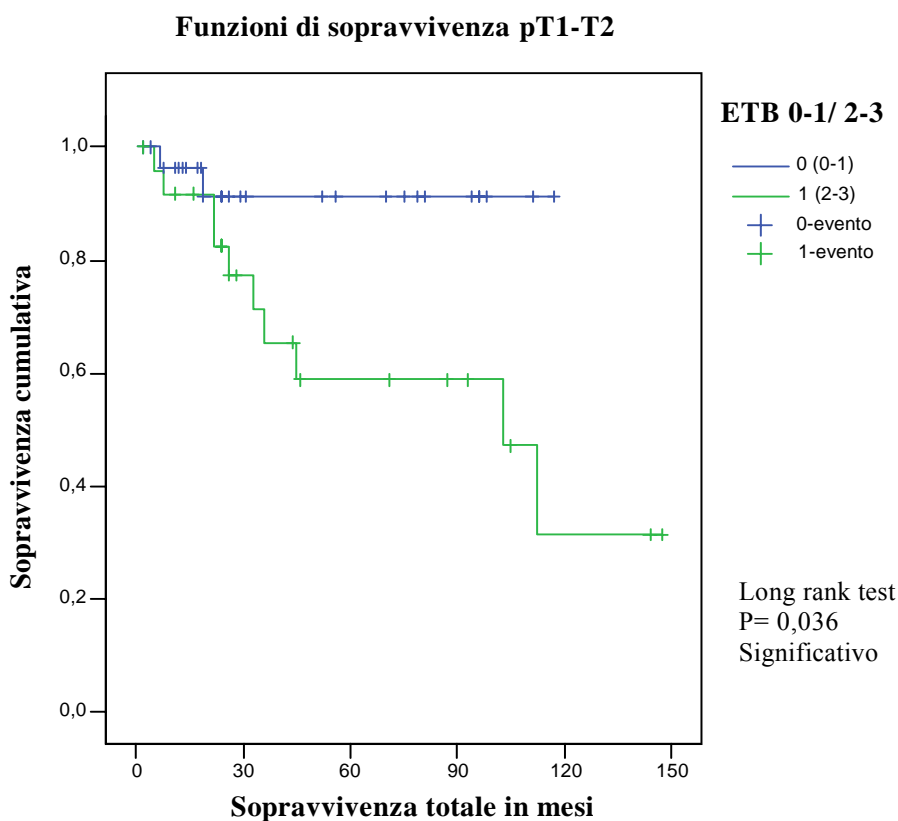
In questo grafico si vede come la distribuzione delle sommatorie per  $ET_{AR}+ET_{BR}$  sia maggiore per bassi e medi valori (0-2 ma soprattutto 2) nei pazienti che non hanno avuto una ripresa evolutiva della malattia, mentre alti valori di sommatoria di  $ET_{AR}+ET_{BR}$  (3 e 5) sono maggiormente frequenti in quei casi che successivamente hanno sviluppato un' avanzamento della malattia. Ambigua rimane l' interpretazione del valore 4. Questa relazione presenta una buona significatività  $P=0,022$ .

Non ci sono stati rilevanti correlazioni tra le varie modalità di ET-1,  $ET_{AR}$ ,  $ET_{BR}$  con le variabili cliniche riguardanti lo stato linfonodale

del tumore primario (pN), il grading (G) e l' HPV, come evidenziato nella tabella XV.

### **Associazione dell' ET axis con la sopravvivenza e l' intervallo libero da malattia**

La funzione che descrive la correlazione esistente tra la sopravvivenza e le varie endoteline è descritta nella seguente curva di Kaplan Meyer.

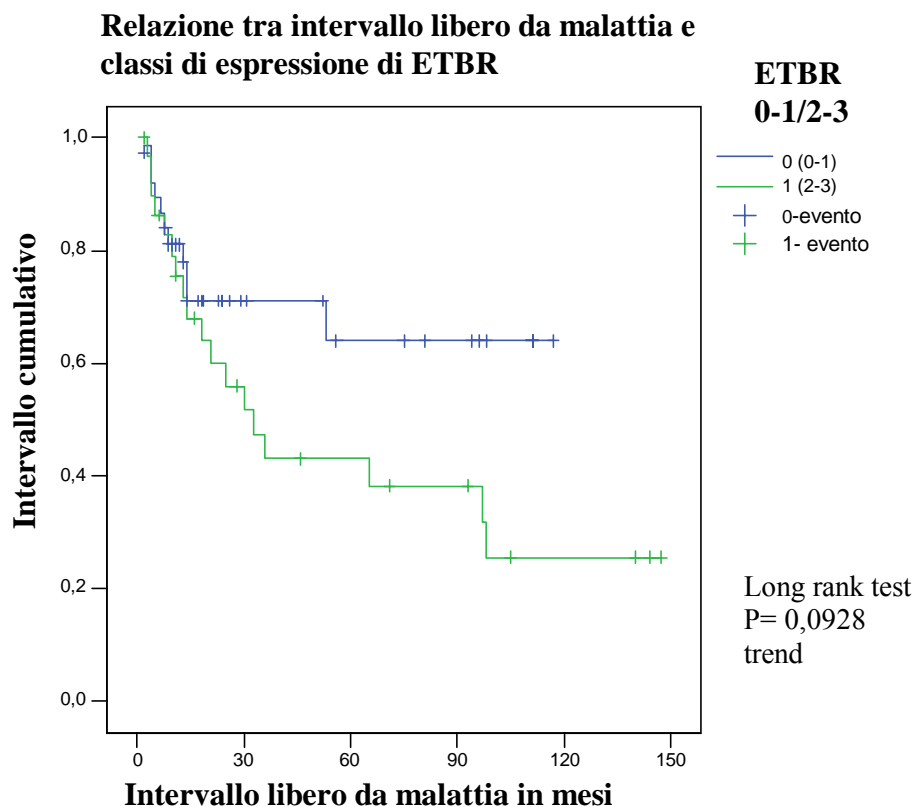


**Figura 25:** Sopravvivenza dei casi T1-T2 rispetto alle classi di espressione di ETBR. (secondo curva di Kaplan Meyer)

Nelle curve in figura 25 si esprime la correlazione tra la sopravvivenza e la diversa espressione dell' ET<sub>B</sub>R (bassa 0-1, alta espressione 2-3) di tutte le pazienti con stadio pT1-T2 alla

diagnosi. Come si può notare le pazienti con alta espressione presentano un maggior decadimento nella curva di sopravvivenza. Infatti circa il 35% dei casi con alta espressione di ET<sub>B</sub>R è deceduto nei primi 30 mesi dalla diagnosi, mentre nel gruppo con bassa espressione di ET<sub>B</sub>R circa il 90% delle pazienti sono ancora vive a 30 mesi. Il long rank test ha un valore significativo P = 0,036.

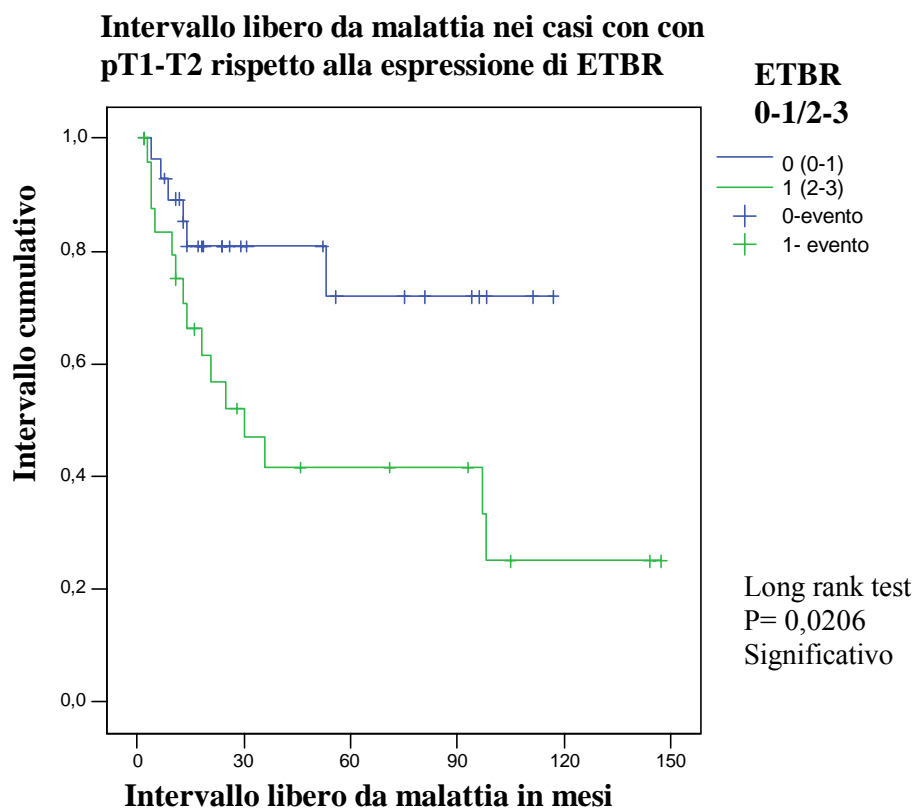
Nel grafico in figura 26 , viene analizzata la curva di intervallo libero da malattia (in mesi dal primo intervento) di tutte le pazienti in correlazione con le diverse classi di espressione dell' ET<sub>B</sub>R (bassa 0-1, alta espressione 2-3).



**Figura 26:** Relazione tra intervallo libero da malattia con il grado di espressione di ETBR (secondo curva di Kaplan Meyer)

In questo grafico si vede come coloro che all'analisi del tessuto neoplastico primario evidenziano un'alta espressione (2-3) di ET<sub>B</sub>R, hanno una diminuzione dell'intervallo libero da malattia, ed una precoce ripresa evolutiva della malattia rispetto al gruppo a bassa espressione (score 0-1). Infatti circa il 45% dei casi con alta espressione sono andati incontro ad una ripresa evolutiva della malattia nei primi 30 mesi, rispetto a circa il 30% dell'altro gruppo. Questo grafico ha una significatività al long rank test pari a 0,0928, rappresentante un trend.

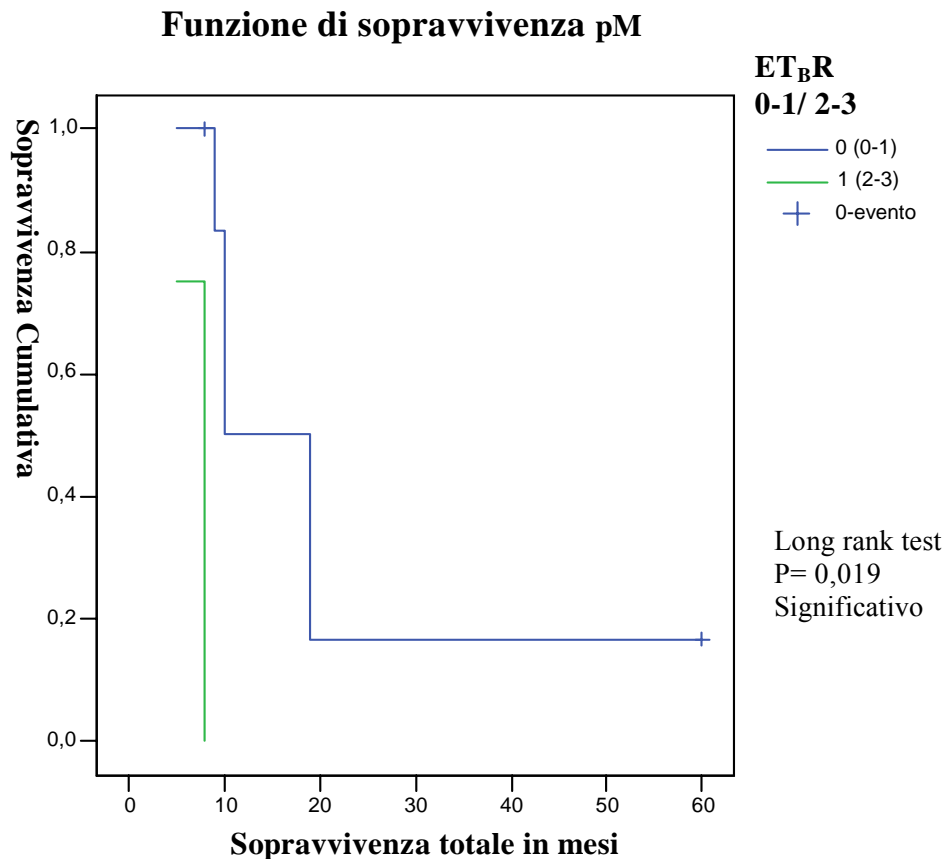
Riproponendo la medesima indagine dell'intervallo libero da malattia su espressione di ET<sub>B</sub>R, ma selezionando solamente le pazienti giunte alla diagnosi con dimensioni del tumore comprese tra lo stadio pT1 e pT2 che hanno poi avuto una ripresa evolutiva della malattia, troviamo invece una significatività elevata (long rank test P=0,0206).



**Figura 27:** Intervallo libero in casi con pT1-T2 (secondo curva di Kaplan Meyer)

In questa curva (figura 27) notiamo come le pazienti con neoplasia con stadio pT1-pT2 che hanno un' alta espressione (score 2-3) per ET<sub>B</sub>R abbiano una maggiore ricaduta dell' intervallo libero da malattia, rispetto al gruppo con bassa espressione. Infatti a 30 mesi dall' intervento circa il 60% dei casi ad alta espressione sono andati incontro ad una ripresa evolutiva della malattia, rispetto al 20% del gruppo a bassa espressione.

Nella figura 28 la curva di Kaplan Meyer esprime la correlazione tra sopravvivenza ed espressione dell' ET<sub>B</sub>R nei pazienti con M positivo.



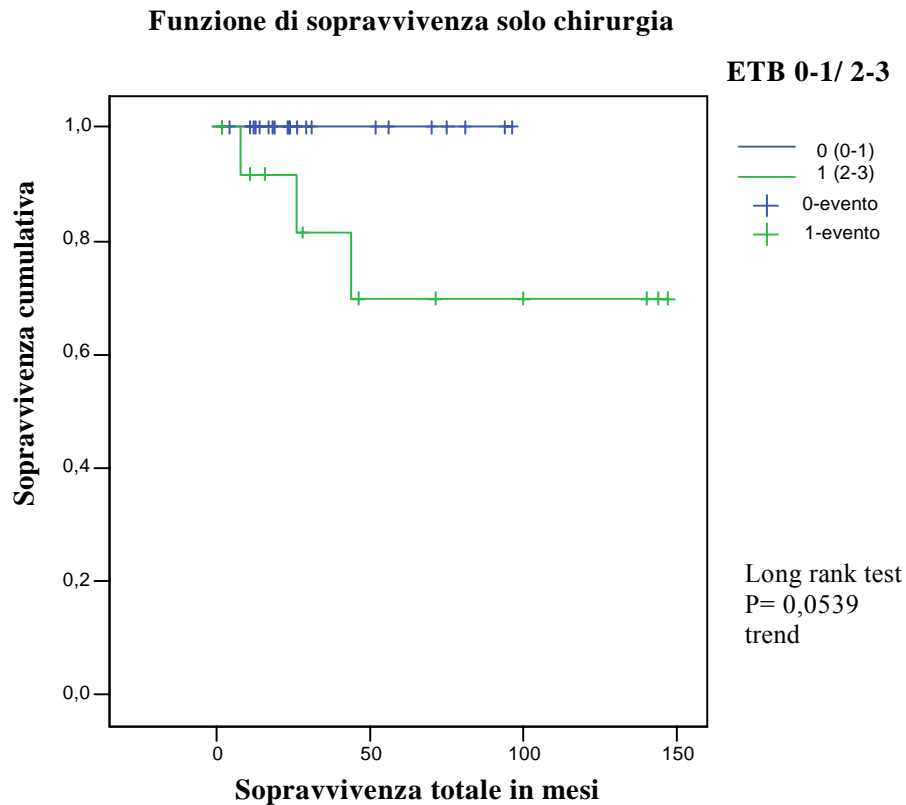
**Figura 28:** Sopravvivenza dei casi con sviluppo di metastasi in relazione con classi di espressione di ETBR (secondo curva di Kaplan Meyer) .

In questo grafico (figura 28) si vede come varia la sopravvivenza rispetto all' espressione di ET<sub>B</sub>R nel gruppo di pazienti che hanno sviluppato metastasi. I casi che presentano un' alta espressione di ET<sub>B</sub>R hanno un decremento maggiore nella curva di sopravvivenza. Questa correlazione ha una significatività P=0,0019, un valore molto significativo.

La figura 29 rappresenta la funzione di sopravvivenza di tutte le pazienti sottoposte al solo trattamento chirurgico (esclusi cioè tutti i casi sottoposti a radioterapia). Questa suddivisione è necessaria



per selezionare un gruppo omogenei per trattamento, e per escludere quelle pazienti con malattia complicata o con prognosi peggiore, che hanno necessitato di un trattamento radioterapico.

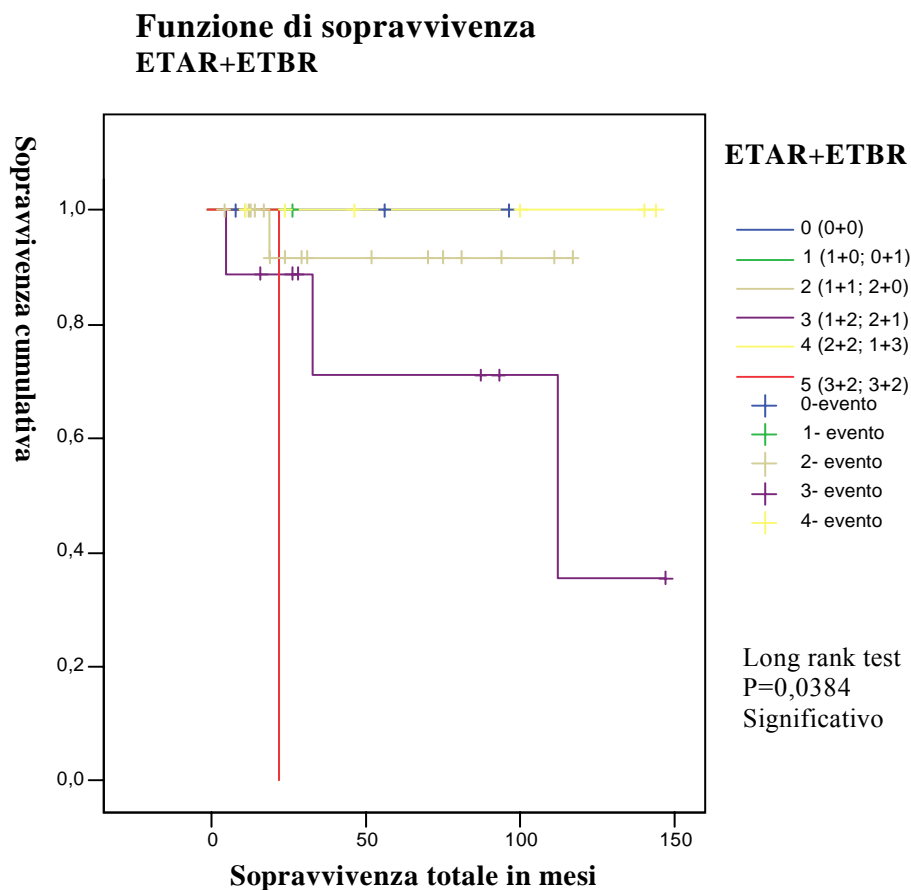


**Figura 29:** Sopravvivenza dei casi omogenei per trattamento in relazione con le differenti classi di espressione per ETBR. (secondo curva di Kaplan Meyer)

Il grafico in figura 29 mostra come, pur in un gruppo di casi omogeneo per trattamento, la curva di sopravvivenza varia con l'espressione dell' ET<sub>B</sub>R. Nei casi con bassa espressione (score 0-1) per ET<sub>B</sub>R si nota un decadimento della curva di sopravvivenza nettamente inferiore rispetto ai pazienti con un' alta espressione di ET<sub>B</sub>R. Infatti si può vedere che circa il 30% delle pazienti con alta espressione di ET<sub>B</sub>R sono decedute entro 50 mesi dall' intervento,

mentre allo stesso periodo, il gruppo a bassa espressione ha ancora una sopravvivenza pari al 100%. Questa ha una significatività al long rank test paria a  $P=0,0539$  che risulta essere un trend.

Nel grafico seguente (figura 30) è rappresentata la funzione di sopravvivenza correlata con la sommatoria dello score (0-3) di espressione dell' ET<sub>AR</sub> ed ET<sub>BR</sub> (non è rappresentato il punteggio 6 poiché non ci sono espressioni per ET<sub>AR</sub> pari a 3).



**Figura 30:** Sopravvivenza in relazione ai valori di sommatoria per ET<sub>AR</sub>+ET<sub>BR</sub>. (secondo curva di Kaplan Meyer)

Si nota come la curva di sopravvivenza decadi velocemente all'

aumentare della sommatoria tranne nel caso di valori pari a 4, la cui curva giace sulla stessa linea di sopravvivenza dei valori 0 ed 1. Questa correlazione ha una buona significatività (P=0,0384).

### **Analisi delle correlazioni con Ki-67 e tra le diverse endoteline.**

Oltre alle correlazioni tra le varie espressioni delle endoteline con le diverse valutazioni clinico-patologiche espresse, sono state eseguite delle correlazioni tra le espressioni delle varie endoteline tra loro. Inoltre è stata eseguita la correlazione tra le endoteline e l'espressione percentuale del Ki-67 (MIB-1). Tutti i risultati di significatività sono riassunti nella tabella seguente (tabella XVII)

**Tabella XVII:** Correlazione tra MIB-1 e l'espressioni delle endoteline e le relazioni tra ET-1, ET<sub>AR</sub> ed ET<sub>BR</sub> tra loro.

	ET-1 0-3	ET-1 01/23	ETAR 0-3	ETAR 01/23	ETBR 0-3	ETBR 01/23	ETAR+ ETBR
MIB %	0,938		0,512	0,395	0,122	0,293	0,553
ETA 0-3	0,009	0,075				0,009	
ETB 0-3	0,011	0,086		0,018			
ET1 0-3				0,327		0,311	0,011
ET1 01/23				0,211		0,07	
ETA 01/23						0,01	
<b>Altamente significativo</b>		<b>Significativo</b>		<b>Trend</b>			

Come si può notare, non ci sono state dei risultati significativi tra le correlazioni dell'espressione del Ki-67(MIB-1) con l'espressione delle varie endoteline.

L'analisi dei rapporti tra le espressioni delle varie endoteline serve per evidenziare il fatto che tutte le endoteline (ET-1 e suoi recettori ET<sub>A</sub>R ed ET<sub>B</sub>R) sono in correlazione tra di loro ed i valori prognostici ricavati sono unidirezionali.

## **5 DISCUSSIONE**

Attualmente i fattori prognostici principali per il carcinoma invasivo squamo-cellulare della vulva sono le dimensioni del tumore (stadio T), la profondità di invasione ed il coinvolgimento linfonodale. Utilizzando questi fattori prognostici vi è una limitata attendibilità della predizione del rischio individuale di sviluppare recidive. Per questo la recente ricerca biomedica ha focalizzato la propria attenzione nei nuovi markers molecolari, che sembrano essere in grado di predire l'evoluzione individuale (outcome) della neoplasia dopo trattamento chirurgico.

In questo studio abbiamo analizzato l'espressione dell' endothelin axis nel tessuto neoplastico primitivo in 68 casi di carcinoma vulvare invasivo. L'obbiettivo del nostro studio è di verificare se l'espressione dell' endothelin axis può avere un valore prognostico in pazienti con carcinoma invasivo della vulva.

### **La popolazione in relazione alla letteratura.**

Il campione selezionato presenta una distribuzione per età in accordo con quanto riportato in letteratura (Joura *et al.*<sup>10</sup>), con una percentuale di casi con età superiore ai 61 anni pari al 60,3 %, e dell' 11,8% con età inferiore ai 41 anni.

Dai dati presentati nella tabella X, la maggioranza dei casi si sono presentati alla diagnosi con uno stadio FIGO III, ed una

dimensione del tumore maggiore di 2 cm (pT pari a 2). La percentuale dei casi positivi all' HPV e la loro distribuzione per fasce d' età, risultano in accordo con la letteratura corrente<sup>21,98</sup> .

Dai dati riguardanti il follow-up possiamo notare come la maggior parte delle recidive (65,6%) si sviluppi entro i primi 18 mesi dall' intervento, giustificando una maggiore frequenza dei controlli di follow-up in questo arco di tempo.

### **Analisi dell'espressione dell' ET axis con le variabili clinico-patologiche**

In questo studio sono state analizzate le intensità di colorazione dell' espressione dell' ET axis in un campione di 68 pazienti. Come riportato nella tabella XIII, l'espressione dell' ET-1 e dei suoi recettori ET<sub>A</sub>R ed ET<sub>B</sub>R è risultata positiva rispettivamente nel 66,2%, nel 92,6% e nel 94,1% dei casi.

I risultati delle intensità di espressione ricavati dall' analisi immunohistochimica del tessuto neoplastico, sono state correlate con le variabili clinico-patologiche e con i dati ricavati dall' analisi del follow-up della popolazione analizzata.

Come si può notare dalla tabella XV dei valori di significatività P ( $\chi^2$  test) vi è una relazione significativa tra ET-1 e le dimensioni del tumore. Elevati livelli di espressione per ET-1 mostrano una correlazione molto significativa (P=0,004) con gli stadi precoci del tumore (pT1-pT2). Questo fatto è ben evidente nelle figure 17 e 18.

Questa relazione inversamente proporzionale tra i livelli di espressione di ET-1 e le dimensioni del tumore (pT) potrebbe essere interpretata con le diverse cinetiche di sviluppo esistenti tra i tumori di piccole dimensioni e quelli di grosse dimensioni. Infatti all'interno di tumori di piccole dimensioni abbiamo una presenza maggiore di fattori favorenti lo sviluppo neoplastico. Si è visto che un prelievo di tessuto eseguito in qualsiasi punto del core delle neoplasie di piccole dimensioni, contiene delle cellule in attiva replicazione, ben supportate dallo sviluppo angiogenetico; mentre un tumore di dimensioni maggiori, ed in stadio avanzato, all'interno del core (ma non in periferia) presenta delle aree di necrosi ed ipoproliferative.

L'espressione di ET-1 suddivisa nei due gruppi di espressione (alto e basso livello), risulta avere una relazione significativa ( $P=0,04$ ) con lo sviluppo di metastasi come evidenziato nella figura 19. Anche in questo caso vi è una correlazione inversamente proporzionale tra livelli di espressione di ET-1 e presenza di metastasi. Questo dato è in relazione continua con quanto sopra riportato riguardante la correlazione di ET-1 e le dimensioni del tumore; poiché nel carcinoma della vulva solamente i tumori di grosse dimensioni sviluppano metastasi.

Dai risultati ottenuti l'espressione dell'ET-1 risulta essere un marker prognostico in relazione dipendente con lo stadio TNM.

Il ruolo esatto espresso dall' $ET_{AR}$  come fattore prognostico nel

carcinoma della vulva rimane sconosciuto. In questo studio non vi sono state associazioni significative tra l'espressione di ET<sub>A</sub>R ed i parametri clinico-patologici valutati. Esso presenta delle correlazioni significative sia con ET-1 che con ET<sub>B</sub>R, (tabella XVII) che sommate alla sua espressione altamente frequente nel nostro campione di pazienti (64 casi su 68 esprimono ET<sub>A</sub>R pari al 92,6%) non possono far escludere un suo ruolo carcinogenetico ed una futura nuova interpretazione come target molecolare. Questo sarà oggetto di approfondimenti in studi futuri.

Dall'analisi dell'espressione di ET<sub>B</sub>R correlata con le variabili clinico-patologiche (tabella XV) possiamo notare delle significative relazioni con la ripresa evolutiva della malattia ( $P=0,01$ ) e con i pazienti liberi da recidive ( $P=0,019$ ). Esiste una relazione proporzionale tra il grado di intensità della colorazione per ET<sub>B</sub>R, espressa nel campione di tessuto neoplastico primario, ed i pazienti che successivamente sono andanti incontro ad una ripresa evolutiva della malattia, come si può notare nei grafici delle figure 26 e 27. Infatti la classe di espressione elevata (2-3) per ET<sub>B</sub>R è più frequentemente rappresentata in questo gruppo di pazienti. Questo risulta essere un fattore prognostico indipendente dalla classificazione TNM. La stessa relazione lineare vi è suddividendo la popolazione in chi era libero dallo sviluppo di qualsiasi recidiva, con chi aveva presentato delle recidive alla data di termine del follow-up. Un'alta espressione di ET<sub>B</sub>R risulta essere prognostica



per un successivo sviluppo di recidive.

Da questi risultati possiamo indicare nell'  $ET_{BR}$  un nuovo marker indipendente da qualsiasi altro fattore prognostico attualmente in uso, che ci aiuta a prevedere il futuro sviluppo individuale della malattia .

Dalla sommatoria dei valori di  $ET_{AR}+ET_{BR}$  è stata ricavata una relazione molto significativa ( $P=0,05$ ) con lo sviluppo di recidive locali, con la ripresa evolutiva della malattia ( $P=0,022$ ) e con l' intervallo libero da recidiva ( $P=0,04$ ). Nonostante questi dati promettenti, l' effettivo utilizzo clinico dei risultati di sommatoria rimane tuttavia ambiguo. Questo perché i valori delle sommatorie di espressione dei due recettori per l' endotelina, non indicano una chiara e netta distinzione tra i gruppi positivi e quelli negativi delle variabili cliniche. L' applicazione clinica della valutazione delle sommatorie è limitata dal fatto che i valori significativi del gruppo positivo e del gruppo negativo sono valori contigui, pertanto la loro corretta valutazione può essere inficiata da errori. Per esempio in tutti i grafici riportati si evidenzia un comportamento diverso tra l' espressione delle sommatorie pari a 2 e quelle pari a 3, ed i valori di 4 sono difficilmente interpretabili. Le relazioni significative comunque sottointendono ad un' elevata espressione per entrambi i recettori ed un ruolo comune nella carcinogenesi che sarà oggetto di studi futuri.

### **Confronto con gli studi riportati in letteratura**

In letteratura molti studi hanno investigato il ruolo del ET-1 e dei suoi due recettori (ET<sub>A</sub>R ed ET<sub>B</sub>R) nella genesi e nella proliferazione di diversi tipi di neoplasie (tabella IX), e quale significato prognostico l' ET axis possa avere. La distribuzione dell' espressione di ET<sub>A</sub>R ed ET<sub>B</sub>R differisce a seconda del tipo di neoplasie e del tessuto coinvolto. Molte hanno una alta espressione di entrambi i recettori, altre hanno una espressione prevalente di ET<sub>A</sub>R ed una ipoespressione di ET<sub>B</sub>R (come nel carcinoma della prostata e dell' ovaio) in altre ancora ad un' alta espressione di ET<sub>B</sub>R coincide una bassa espressione di ET<sub>A</sub>R, come nel caso del melanoma. Nel nostro studio vi è una alta espressione di entrambi i recettori, (92,6% e 94,1% rispettivamente per ET<sub>A</sub>R ed ET<sub>B</sub>R).

Il nostro studio per la valutazione dell' espressione delle endoteline come fattore prognostico è stato condotto su campioni di tessuto con carcinoma della vulva di tipo squamo-cellulare. Alcune comparazioni possono essere eseguite con il lavoro di Ishibashi *et al.*<sup>118</sup>, l' unico studio, di nostra conoscenza, presente in letteratura sulla valutazione dell' espressione delle endoteline come markers prognostici per il carcinoma squamo-cellulare dell' esofago. In quel lavoro sono state valutate le sommatorie dei valori di espressione per ET-1, ET-2, ET-3 nel tessuto neoplastico e nei tessuti displastici e normali adiacenti la neoplasia. L' espressione delle endoteline sul tessuto neoplastico e displastico hanno prodotto dei

risultati poco significativi, invece l'alta espressione delle endoteline nella mucosa normale ha riportato i risultati più interessanti, poiché vi è una correlazione significativa con l'invasione linfonodale, lo sviluppo di metastasi linfonodali ed a distanza; inoltre è in relazione con una diminuzione dell'intervallo libero da malattia.

Questo studio ci suggerisce che anche il tessuto sano adiacente alla lesione neoplastica può essere oggetto di una ricerca sull'espressione dell'ET-1, ET<sub>A</sub>R ed ET<sub>B</sub>R mediante colorazioni immunoistochimiche, e che questa ricerca potrebbe avere un ruolo prognostico e rivelare nuove ed interessanti relazioni con le principali variabili clinico-patologiche.

### **Applicazioni cliniche**

Dai risultati riportati si è evidenziato come l'espressione di ET<sub>B</sub>R sia il marker prognostico più significativo ed indipendente da qualsiasi altro fattore prognostico attualmente in uso.

Clinicamente sarà possibile ottenere da una semplice indagine immunoistochimica con anticorpi anti ET<sub>B</sub>R nuove ed ulteriori informazioni prognostiche sulle pazienti affette da carcinoma invasivo della vulva.

Un'alta espressione dell'intensità di colorazione per ET<sub>B</sub>R è correlata significativamente con la ripresa evolutiva della malattia (P=0,01) e con lo sviluppo di recidive (P=0,019), ed è in relazione

significativa con una diminuzione della sopravvivenza e dell'intervallo libero da malattia nei casi con pT1-pT2; inoltre propone un trend con il coinvolgimento linfonodale, con lo sviluppo di metastasi e con la morte del paziente.

In base alla classe di espressione di ET<sub>B</sub>R sarà possibile valutare un' approccio terapeutico diverso da quello attualmente standardizzato; come nel caso di pazienti con stadio pT1-T2 che esprimono alti livelli di ET<sub>B</sub>R sarà possibile valutare la possibilità di eseguire una terapia maggiormente aggressiva, che comprenda anche l' impiego di una radioterapia o chemio-radioterapia adiuvante. Oppure nel caso di pazienti con alte espressioni di ET<sub>B</sub>R che con gli attuali fattori prognostici appartengono al medesimo gruppo per il quale vi è la sola indicazione chirurgica, possono essere anch'essi valutabili per un trattamento radioterapico adiuvante.

Con la valutazione dell' espressione dell' ET<sub>B</sub>R è possibile individuare i pazienti con un minore intervallo libero da malattia e con un rischio maggiore di avere una ripresa evolutiva della malattia a breve e medio termine e pertanto poter applicare un follow-up più attento con visite di controllo più frequenti.

L' utilità clinica della determinazione dell' espressione di ET<sub>B</sub>R è nella possibilità di disporre di un' ulteriore marker prognostico che va ad affiancare i fattori prognostici attualmente in uso (TNM, coinvolgimento linfonodale e profondità di invasione) e che

permette un' ulteriore personalizzazione della terapia e dell' impostazione del follow-up.

L'utilizzo dell' espressione di ET-1 risulta essere clinicamente più limitato. Esiste una relazione inversa tra l' espressione di ET-1 e le dimensioni del tumore e la presenza di metastasi. Il suo impiego può risultare utile nelle valutazioni del TNM.

L' applicazione in clinica delle sommatorie di espressione di ET<sub>A</sub>R+ET<sub>B</sub>R risulta limitato, ma servono per chiarire l' unidirezionalità prognostica dei due recettori.

Dagli ultimi studi si sta sperimentando un nuovo approccio terapeutico per i tumori con espressioni elevate dell' ET axis, utilizzando i recettori ETAR ed ETBR come dei target molecolari. Questa nuova strategia per limitare la crescita e l' espansione neoplastica, si basa sull' utilizzo di inibitori selettivi per i recettori dell' endotelina, come l' Atrasentan per ET<sub>A</sub>R ed A-182086 per l' ET<sub>B</sub>R, come riportato negli ultimi lavori di Bagnato *et al.*<sup>121</sup> e Rossano *et al.*<sup>122</sup>.



## **6 CONCLUSIONE**

In conclusione questo studio è in grado di dimostrare come l'espressione di ET-1 e dei suoi recettori ET<sub>A</sub>R ed ET<sub>B</sub>R sia altamente presente nei 68 casi di carcinoma invasivo della vulva analizzati.

L'espressione di ET<sub>B</sub>R è il marker prognostico principale, indipendente da qualunque fattore prognostico attualmente in uso.

L'espressione di ET-1 è correlata con le dimensioni del tumore.

L'espressione di ET<sub>A</sub>R non è correlata con alcuna variabile, ed il suo ruolo rimane tutt'ora sconosciuto.

Questi risultati suggeriscono che in aggiunta agli usuali fattori di rischio ed ai criteri di classificazione TNM, la misurazione dell'espressione dell' endothelin axis mediante analisi immunohistochimica può essere usata in futuro nel predire la prognosi delle pazienti con carcinoma squamocellulare invasivo della vulva.





## **7 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

- 
- <sup>1</sup> D'Addato F., Attini R. Carcinoma della Vulva. In: Ginecologia e Ostetricia. Wierdis T., Romanini C., Alba E., Arduini D., D'Addato F., Grio R., Mollica G., Montoneri C., Sisoni P., Surico N., Todros T., Vesce F., Volpe A. eds. Minerva Medica Publ, Torino, 2003, pp104-107.
- <sup>2</sup> Merpohl H.G. Carcinoma della vulva. In: Oncologia Ginecologica Pratica. Baltzer J., Meerpohl H.G., Bahnsen J. eds, CIC Edizioni Internazionali Publ, Roma, 2001, pp132-149.
- <sup>3</sup> Wilkinson E.J. Premalignant and Malignant Tumors of the Vulva. In: Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. Kurman R.J. ed, Springer-Verlag Publ., New York, 2002, pp 99-149.
- <sup>4</sup> Neto A.G., Deavers M.T., Silva E.G., Malpica A. Metastatic Tumors of the Vulva. Am. J. Surg. Pathol. 2003; 27(6): 799-804.
- <sup>5</sup> Estimated New Cancer Cases and Death by Sex for All Sites, US 2005. American Cancer Society. Disponibile in internet presso [www.cancer.org](http://www.cancer.org).
- <sup>6</sup> Office of National Statistics (ONS). Cancer Statistics Registrations. Series NB1, Number 30. 2002. Disponibile in internet presso [www.statistics.gov.uk](http://www.statistics.gov.uk).
- <sup>7</sup> Engel J, Schubert-Fritschle G, Hölzel D. Epidemiologie. In: Vulvakarziom. Kimming R, Kürzl R., Höß C., Straub J., Hillemanns P., Diebold J. eds. Tumorzentrum München W. Zuckschwerdt Publ, München, Bern, Wien, New York, 2001. pp 1-5.
- <sup>8</sup> Parkin D.M, Whelan S.L., Ferlay J. Cancer incidence in Five Continents VII. Lyon, France, IARC, 1997.
- <sup>9</sup> Sturgeon S.R, Brinton L.A, Devesa S.S., Kurman R.J. In situ and invasive vulvar cancer incidence trends (1973-1987). Am. J. Obstet. Gynecol. 1992; 166:1482-1485.
- <sup>10</sup> Joura EA. Epidemiology, diagnosis and treatment of vulvar intraepithelial neoplasia. Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 2002; 14:39-43.
- <sup>11</sup> Quinn M.A. Epidemiology of Cervical, Vulvar and Vaginal Cancers. In Gynecologic Cancer: Gershenson D.M., McGuire W.P., Gore M., Quinn M.A., Thomas G. eds. Elsevier Ltd. Publ., Philadelphia, 2004. pp 20-30.

- 
- <sup>12</sup> MacLean A.B. Vulvar cancer: the past 100 years, and into the next century. The Presidential Oratorio, British Society for the study of Vulva Disease, 2002. *J. Obstet. Gynecol.* Agosto 2004. 24(5); 491-497.
- <sup>13</sup> Mesroglu M., Lellè R.J. Vulvakarzinom bei einem 13jährigen Mädchen. *Geburtsh. u. Frauenheilk.* Oct.1986; 46(10); 754-755.
- <sup>14</sup> Iversen T., Tretli S.: Intraepithelial and invasive squamous cell neoplasia of the vulva: trends in incidence, recurrence, and survival rate in Norway. *Obstet Gynecol* 1998;91:969-972.
- <sup>15</sup> Howe H.L., Wingo P.A.I. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998) featuring cancers with recent increasing trends (comment). *J. Nat. Cancer Inst.* 2001; 93: 824-842.
- <sup>16</sup> Ries L.A.G., Eisner M.P.I. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2000. Bethesda, MD, National Cancer Institute, 2003
- <sup>17</sup> Darling J.R., Sherman K.J, Hislop T.G.: Cigarette smoking and the risk of anogenital cancer. *Am. J. Epidemiol.* 1992; 135: 180-189.
- <sup>18</sup> Sherman K.J., Darling K.J, Chu J.: Genital warts, other sexually transmitted disease, and vulvar cancer. *Epidemiology* 1991; 2: 257-262
- <sup>19</sup> Sturgeon S.R., Ziegler R.G. et al. Diet risk of vulvar cancer. *Ann. Epidemiol.* 1991; 1: 427-437.
- <sup>20</sup> Crum C.P. Carcinoma of the vulva: Epidemiology and pathogenesis (review). *Obstet. Gynecol.* 1992, 79: 448-454.
- <sup>21</sup> Monk B.J., Burger R.A., Lin F., Parham G., Vasilev S.A., Wilczynski S.P.: Prognostic significance of human papillomavirus (HPV) DNA in primary invasive vulvar cancer. *Obstet. Gynecol.* 1995;85:709-715.
- <sup>22</sup> Andersen W.A., Franquemont D.W., Williams J., Taylor P.T., Crum C.P.: Vulvar squamous cell carcinoma and papillomaviruses: two separate entities? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1991;165:329-335.
- <sup>23</sup> Kurman R.J., Toki T., Schiffman M.H. Basaloid and warty carcinomas of the vulva: Distinctive types of squamous cell carcinoma frequently associated with human papillomaviruses. *Am. J. Surg. Pathol.* 1993; 17:133-145

- 
- <sup>24</sup> Brinton L.A., Nasca P.C. et al. Case control study of cancer of the vulva. *Obstet. Gynecol.* 1990; 75:859-866.
- <sup>25</sup> Trimble C.L., Hildesheim A., Brinton L.A., et al. Heterogeneous etiology of squamous cell carcinoma of the vulva. *Obstet. Gynecol.* 1996; 87:59-64.
- <sup>26</sup> Gillison M.L., Shah K.V: Role of mucosal human papillomavirus in non genital cancers. *J. Nat. Cancer Inst. Monogr.* 2003; 31:57-65.
- <sup>27</sup> Madeline M.M., Daling J.R., Carter J.J., et al.: Cofactors with human papillomavirus in a population-based study of vulvar cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 1997; 89:1516-1523.
- <sup>28</sup> Carter J.J., Mandelaine M.M, Shera K. et al.: human papillomavirus 16 and 18 L1 serology compared across anogenital cancer sites. *Cancer Res.* 2001; 61:1934-1940.
- <sup>29</sup> Tjalma W.A.A., Arbyn M., Paavonen J., Van Waes T.R., Bogers J.J.: Prophylactic human papillomavirus vaccines: the beginning of the end of cervical cancer. *Int. J.Gynecol. Cancer* 2004; 14(5): 751-757.
- <sup>30</sup> Hildesheim A., Han C.L, Brinton L.A. : Human papillomavirus type 16 and risk of perinvasive and invasive vulvar cancer: Results from a seroepidemiological case-control study. *Obstet. Gynecol.* 1997; 90:748-754.
- <sup>31</sup> Petry K.U., Kochel H et al. : Human papillomavirus is associated with the frequent detection of warty and basaloid high-grade neoplasia of the vulva and cervical neoplasia among immunocompromised women. *Gynecol. Oncol.* 1996; 60:30-34.
- <sup>32</sup> Ferenczy A., Coutlèe F., Franco E., Hankins C. Human papillomavirus and HIV coinfection and the risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments. *Canad. Med. As. J.* 2003; 5:169-180.
- <sup>33</sup> Edwards C.L., Balat O.: Characteristics of patients with vulvar: an analysis of 94 patients. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 1996; 17:351-353.
- <sup>34</sup> Franklin E.W., Rutledge F.D.: Epidemiology of epidermoid carcinoma of the vulva. *Obstet. Gynecol.* 1972;39:165-170.
- <sup>35</sup> Apparato genitale femminile. In *Anatomia del Gray*. Williams P.L., Warwick R. Dyson M. Bannister L.H. Zanichelli Editore Publ, Bologna: 1994; pp 1422-1423.

- 
- <sup>36</sup> Bornstein J., Pascal B., Abramovici H.: The common problem of vulvar pruritus. *Obstet. Gynecol. Surv.* 1993; 48:111-118.
- <sup>37</sup> Maggino T., Alessi C., Vettori N., Solda M.: Lesioni preinvasive della vulva. In: *Patologia benigna e carcinoma della vulva. Oncologia 2002.* Disponibile in internet presso <http://www.apog.it/Onco/onco02/onco02.htm>
- <sup>38</sup> Hart W.R.: Vulvar intraepithelial neoplasia: Historical aspects and current status. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2001; 20:16-30.
- <sup>39</sup> Yang B., Hart W.R.: Vulvar intraepithelial neoplasia of the simplex (differentiated) type: a clinicopathologic study using including analysis of HPV and p53 expression. *Am. J. Surg. Pathol.* 2000; 24:429-441.
- <sup>40</sup> Jones R.W., Rowan D.M.: Vulvar intraepithelial neoplasia III: A clinical study of the outcome of 113 cases with relation to the later development of invasive vulvar carcinoma. *Obstet. Gynecol.* 1994; 84:741-745.
- <sup>41</sup> Jones R.W., Rowan D.M.: Spontaneous regression of vulvar intraepithelial neoplasia 2-3. *Obstet. Gynecol.* 2000; 96:470-472.
- <sup>42</sup> Herod J.J.O., Shah M.I., Rollason T.P., et al.: Vulvar intraepithelial neoplasia: long term follow up of treated and untreated women. *Brit J. Obstet. Gynecol.* 1996;103;446.
- <sup>43</sup> Tying S.K.: Vulvar squamous cell carcinoma: Guidelines for early diagnosis and treatment. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2003; 189:S17-S23.
- <sup>44</sup> Kowan J.L., Young T.K., Kyu R.K., Hy S.K., Aalto Y., Sakari K.: Loss in 3p and 4p and gain of 3q are concomitant aberrations in Squamous cell carcinoma of the vulva. *Mol. Pathol.* 2001; 14(5):377-381.
- <sup>45</sup> Chan M.K., Cheung T.H., Chung T.K., : Expression of p16INK4 and retinoblastoma protein Rb in vulvar lesion of Chinese women. *Gynecol. Oncol.* 1998; 68:156-161.
- <sup>46</sup> Zamparelli A., Masciullo V., Bovicelli A., et al.: Expression of cell-cycle-associated proteins pRB2/p130 and p27kip in vulvar squamous cell carcinomas. *Hum. Pathol.* 2001; 32: 4-9.
- <sup>47</sup> Gasco M., Sullivan A., Repellin C., Brooks L., Farrell P.J., Tidy J.A., Dunne B., Gusterson B., Evans D.J., Crook T.: Coincident inactivation of 14-3-3s and p16INK4a is an early event in vulval squamous neoplasia. *Oncogene.* 2002; 21:1876-1881.

- 
- <sup>48</sup> Holway A.H., Rieger-Christ K.M., Miner W.R.: Somatic mutation of PTEN in vulvar cancer. *Clin. Cancer Res.* 2000; 62:3228-3235.
- <sup>49</sup> Ferrandina G., Ranelletti F.O., Salutari V., Gessi M., Legge F., Zannoni G.F., Scambia G., Lauriola L.: Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in non-neoplastic and neoplastic vulvar epithelial lesions. *Gynecol. Oncol.* 2004; 92:537-544.
- <sup>50</sup> Doldi N., Origoni M., Bassan M., Ferrari D., Rossi M. Ferrari M.: Vascular endothelial growth factor. Expression in human vulvar neoplastic and nonneoplastic tissues. *J. Reprod. Med.* 1996; 41:844-848.
- <sup>51</sup> Bancher-Todesca D., Obermair A., Bilgi S., Kohlberger P., Kainz C., Breitenecker G., Leodolter S., Gitsch G.: Angiogenesis in vulvar intraepithelial neoplasia. *Gynecol. Oncol.*, 1997; 64: 496-500.
- <sup>52</sup> Obermair A., Kohlberger P., Bancher-Todesca D., Tempfer C., Sliutz G., Leodolter S., Reinthaller A., Kainz C., Breitenecker G., Gitsch G.: Influence of microvessel density and vascular permeability ability factor/vascular endothelial growth factor expression on prognosis in vulvar cancer. *Gynecol. Oncol.*, 1996: 63:204-209.
- <sup>53</sup> Qureshi F., Munkarah A., Banerjee M., Jacques S. M.: Tumor angiogenesis in vulvar squamous cell carcinoma. *Gynecol. Oncol.*, 1999; 72:65–70.
- <sup>54</sup> Hefler L., Tempfer C., Obermair A., Frischmuth K., Sliutz G., Reinthaller A., Leodolter S., Kainz C.: Serum concentrations of vascular endothelial growth factor in vulvar cancer. *Clin. Cancer Res.*, 1999; 5: 2806-2809.
- <sup>55</sup> Goff B.A., Muntz H.G., Greer B.E., Tamimi H.K., Gown A.M.: Oncogene expression: long-term compared with short-term survival in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Obstet. Gynecol.* 1998;92:88-93.
- <sup>56</sup> Salvesen H.G., Iversen O.E., Akslen L.A.: Identification of high-risk patients by assessment of nuclear Ki-67 expression in a prospective study of endometrial carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 1998; 4:2779-2785.
- <sup>57</sup> Hendricks J.B., Wilkinson E.J., Kubilis P., Drew P., Blaydes S.M., Munakata S.: Ki-67 expression in vulvar carcinoma. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 1994; 13(3):205-210.
- <sup>58</sup> Marchetti M., Salmaso R., Polonio S., Perin D., Salviato T., Onnis A.: Ki-67 expression in vulvar carcinoma. Preliminary results. *Eur J Gynaecol Oncol.* 1996; 17(5):361-364.

- 
- <sup>59</sup> Scurry J., Beshay V., Cohen C., Allen D.: Ki67 expression in lichen sclerosus of the vulva in patients with and without associated squamous cell carcinoma. *Histopathology* 1998; 32: 399-404.
- <sup>60</sup> Al-Ghamdi A., Freedman D., Miller C., Poh M., Rosin M., Zhang L., Gilks C.B.: Vulvar squamous cell carcinoma in young women: a clinicopathologic study of 21 cases. *Gynecol. Oncol.* 2002; 84: 94-101.
- <sup>61</sup> Escobar P.F., Belinson J.L., White A., Shakhova N.M., Feldchtein F.I., Kareta M.V., Gladkova N.D.: Diagnostic efficacy of optical coherence tomography in the management of preinvasive and invasive cancer of uterine cervix and vulva. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 2004; 14:470-474.
- <sup>62</sup> Bellin M.F., Roy C., Kinkel K., et al.: Lymph node metastasis: safety and effectiveness of MR imaging with ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles-initial clinical experience. *Radiology* 1998; 207:799-808.
- <sup>63</sup> Sohaib S.A.A., Moskovic E.C.: Imaging in vulval cancer. *Clin. Obstet. Gynecol.* 2003, 17(4): 543-556.
- <sup>64</sup> Origoni M., Dindelli M., Ferrari D., Frigerio L., Rossi M., Ferrari A.: Surgical staging of invasive squamous cell carcinoma of the vulva: analysis of treatment and survival. *Int. Surg.* 1996; 81:67-70.
- <sup>65</sup> Ghurani G.B., Penalver M.A. An update on vulvar cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2001; 185:294-299.
- <sup>66</sup> Homesley H.D., Bundy B.N., Sedlis A.: Assessment of current international federation of gynecology and obstetrics staging of vulvar carcinoma relative to prognostic factors for survival (a gynecology oncology group study). *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1991; 164:997-1004.
- <sup>67</sup> van der Velden J. Controversies in early vulvar cancer. In: *Gynecologic Cancer*. Gershenson D.M., McGuire W.P., Gore M., Quinn M.A., Thomas G.(eds). Elsevier Ltd Publ, Philadelphia, 2004.pp 92-103.
- <sup>68</sup> van der Velden J., Kooyman C.D., van Lindert A.C.M., Heinty A.P.M.: A stage Ia vulvar carcinoma with an inguinal lymph node recurrence after local excision. A case report and literature review. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 1992, 2:125-128.
- <sup>69</sup> Atamedede F., Hoogerland D.: Case report. Regional lymph node recurrence following local excision for microinvasive vulvar carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 1989; 34:125-128.

---

<sup>70</sup> de Hullu J.A., Oonk M.H.M., van der Zee A.G.J.: Modern management of vulvar cancer. *Curr. Op. in Obstet. Gynecol.* 2004; 16:65-72.

<sup>71</sup> Heaps J.M., Fu Y.S., Montz F.J., Hacker N.F., Berek J.S.: Surgical-pathologic variables predictive of local recurrence in squamous cell carcinoma of the vulva. *Gynecol. Oncol.* 1990;38:309-314.

<sup>72</sup> Marsden D.E., Hacker N.F.: Contemporary management of primary carcinoma of the vulva. *Surg. Clin. North. Am.* 2001;81:799-813.

<sup>73</sup> Hopkins M.P., Reid G.C., Vettrano I., Morley G.W.: Squamous cell carcinoma of the vulva: prognostic factors influencing survival. *Gynecol. Oncol.* 1991; 43:113-117.

<sup>74</sup> Homesley H.D., Bundy B.N., Sedlis A., Yordan E., Berek J.S., Jahshan A.: Prognostic factors for groin node metastasis in squamous cell carcinoma of the vulva (a Gynecologic Oncology Group Study). *Gynecol. Oncol.* 1993; 49:279-283.

<sup>75</sup> Benedetti Panici P., Angioli R., Muzzii L., Manci N., Palaia I.: Linfadenectomia inguinale con tecniche microinvasive e linfonodo sentinella. In: *Patologia benigna e carcinoma della vulva. Oncologia 2002.* Disponibile in internet presso <http://www.apog.it/Onco/onco02/onco02.htm>

<sup>76</sup> Andrews S.J., Williams B.T., DePriest P.D., Gallion H.H., Hunter J.E.: Therapeutic implications of lymph nodal spread in lateral T1 and T2 squamous cell carcinoma of the vulva. *Gynecol. Oncol.* 1994,55:41-46.

<sup>77</sup> Stehman F.B., Bundy B.N., Dvoretzky P.M., Creasman W.T.: Early stage I carcinoma of the vulva treated with ipsilateral superficial inguinal lymphadenectomy and modified radical hemivulvectomy: a prospective study of the Gynecologic Oncology Group. *Obstet. Gynecol.* 1992;79:490-497.

<sup>78</sup> Levenback C., Burke T.W., Morris M., Malpica A., Lucas K.R., Gershenson D.M.: Potential applications of intraoperative lymphatic mapping in vulvar cancer. *Gynecol. Oncol.* 1995;59:216-220.

<sup>79</sup> Gordinier M.E., Malpica A., Burke T.W., et al.: Groin recurrence in patients with vulvar cancer with negative node on superficial inguinal lymphadenectomy. *Gynecol. Oncol.* 2003; 90:625-628.

<sup>80</sup> Burger M.P.M., Hollema H., Bouma J.: The side of groin node metastasis in unilateral vulvar carcinoma. *Int. Gynecol. Cancer.* 1996; 6:318-322.

- 
- <sup>81</sup> Jackson K.S., Das N., Naik R., Lopes A. Monaghan J.M.: Controlateral groin node metastasis following ipsilateral groin node dissection in vulval cancer: a case report. *Gynecol. Oncol.* 2003; 89:529-531.
- <sup>82</sup> Origoni M., Sideri M., Garsia S., Carinelli S.G., Ferrari A.G.: Prognostic value of pathological patterns of lymph node positivity in squamous cell carcinoma of the vulva stage III and IVA FIGO. *Gynecol. Oncol.* 1992; 45:313-316.
- <sup>83</sup> van der Velden J., van Lindert A.C.M., Lammes F.B., ten Kate F.J.W., Sie-Go D.M.S., Oosting H.: Extracapsular growth of lymph node metastases in squamous cell carcinoma of the vulva. *Cancer* 1995;75:2885-2890.
- <sup>84</sup> Levenback C., Burke T.W., Gershenson D.M., et al.: Intraoperative lymphatic mapping for vulvar cancer. *Obstet. Gynecol.* 1994; 84:163-167.
- <sup>85</sup> Merisio C., Berretta R., Gualdi M., Pultrone D.C., Anfuso S., Agnese G., Aprile C., Mereu L., Salamano S., Tatteo S., Melpignano M.: Radioguided sentinel lymph node detection in vulvar cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2005; 15: 493-497.
- <sup>86</sup> Sanidas E.E., Daskelakis M., Sbyrakis N., Tsiftsis D.D.: Modifications of the learning curve guidelines for breast cancer sentinel node biopsy. *Eur J Surg Oncol.* 2005;31:357-363.
- <sup>87</sup> de Hullu J.A., van der Zee A.G. : Sentinel node techniques in cancer of the vulva. *Curr Womens Health Rep.* 2003;3:19-26.
- <sup>88</sup> de Hullu J.A., Oonk M.H.M., Ansink A.C., Hollema H., Jager P.L., van der Zee A.G.J.: Pitfalls in the sentinel lymph node procedure in vulvar cancer. *Gynecol. Oncol.* 2004; 94: 10-15.
- <sup>89</sup> Terada K.Y., Shimizu D.M., Wong J.H.: Sentinel node dissection and ultrastaging in squamous cell cancer of the vulva. *Gynecol Oncol.* 2000;76:40-44.
- <sup>90</sup> Dhar K.K., Woolas P.R.: Changes in management of vulval cancer. *Clin. Obstet. Gynecol.* 2003;17:529-542.
- <sup>91</sup> Zola P., Landoni F., Crippa G.C., Ferrero A., Lapressa M., Magistris A.: Carcinoma della vulva : Diagnosi e terapia. In: *Patologia benigna e carcinoma della vulva. Oncologia* 2002. Disponibile in internet presso <http://www.apog.it/Onco/onco02/onco02.htm>



- 
- <sup>92</sup> Di Leo S., Benedetti Panici P.L., Bolis P.F., Di Re F., Pecorelli S., Sbiroli C.: Carcinoma della vulva. In: Le linee guida. Ginecologia ginecologica. Disponibile in internet presso <http://www.sigo.it/lineeguida1.html#vulva>
- <sup>93</sup> Burke T.W., Russell A.H.: Advanced-stage vulvar cancer. In: Gynecologic Cancer. Gershenson D.M., McGuire W.P., Gore M., Quinn M.A., Thomas G.eds. Elsevier Ltd.Publ. Philadelphia, 2004, pp105-112.
- <sup>94</sup> Hoffman S.M.: Squamous-cell carcinoma of the vulva: locally advanced disease. Clin. Obstet. Gynecol. 2003; 17(4) 635-647.
- <sup>95</sup> Blake P.: Radiotherapy and chemotherapy for carcinoma of the vulva. Clin. Obstet. Gynecol. 2003;17(4): 649-661.
- <sup>96</sup> Barton D.P.J.: The prevention and management of treatment related morbidity in vulval cancer. Clin. Obstet. Gynecol. 2003; 17(4): 683-701.
- <sup>97</sup> Hacker N.F.: Vulvar cancer. In: Practical gynecologic oncology. Berek J.S, Hacker N.F., eds. Williams & Wilkins Publ. Batimore,2000, pp 553-596.
- <sup>98</sup> Maggino T., Landoni F., Sartori E., Zola P., Gadducci A., Alessi C., Soldà M., Coscio S., Spinetti G., Maneo A., Ferrero A., Kosishi de Toffoli G.: Pattern of recurrence in patients with squamous cell carcinoma of the vulva.: a multicentre CTF study. Cancer 2000, 89;116-122.
- <sup>99</sup> Frumovity M., Ramirez P.T., Tortolero-Luna G., Malpica A., Eifel P., Burke T.W., Levenback C.: Characteristics of recurrence in patients who underwent lymphatic mapping for vulvar cancer. Gynecol. Oncol. 2004; 92:205-210.
- <sup>100</sup> Coulter J., Gleeson N.: Local and regional recurrence of vulval cancer: management dilemmas. Clin. Obstet. Gynecol. 2003; 17(4): 663-681.
- <sup>101</sup> Oonk M.H.M., de Hullu J.A., Hollema H., Mourits M.J.E., Pras E, Wymenga A.N.M., van der Zee A.G.J.: The value of routine follow up in patients treated for carcinoma of the vulva. Cancer 2003; 98(12): 2624-2629.
- <sup>102</sup> Maggino T., Soldà M., Gaducci A. Diagnosi e terapia delle recidive del carcinoma della vulva. In: Patologia benigna e carcinoma della vulva. Oncologia 2002. Disponibile in internet presso <http://www.apog.it/Onco/onco02/onco02.htm>

---

<sup>103</sup> Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y., Yazaki Y., Goto K., Masaki T.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cell. *Nature*. 1988; 332:411-415.

<sup>104</sup> Nelson J., Bagnato A., Battistini B., Niesen P.: The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2003; 3:110-116.

<sup>105</sup> Bagnato A., Natali P.G.: Endothelin receptors as novel targets in tumor therapy. *J. Transl. Med.* 2004; 2: 16-25. Disponibile in internet presso: <http://www.translational-medicine.com/content/2/1/16>

<sup>106</sup> Bagnato A., Catt KJ.: Endothelin as autocrine regulators of tumor cell growth. *Trends Endocr. Metab.* 1998; 9: 378-383.

<sup>107</sup> Battistini B., Chailier P., D'Orleans-Juste P., Briere N., Sirois P. : Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides*. 1993; 14: 385-399.

<sup>108</sup> Pristivishalil G., Nelson J.B.: Endothelin-derived factors as apracrine mediators of prostate cancer progression. *Prostate* 2000; 44: 44-77.

<sup>109</sup> Salani D., Di Castro V., Nicotra M.R., Rossano L., Tecce R., Venuti A., Natali P.G., Bagnato A.: Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *Am. J. Pathol.* 2000; 157:1537-1547.

<sup>110</sup> Spinella F., Rosano L., Di Castro V, Natali P.G., Bagnato A.: Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1 alpha in ovarian carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 27850-27855.

<sup>111</sup> Nelson J.B., Hedican S.P., George D.J., Reddi AH., Piantadosi S, Eisenberger M.A., Simons JW.: Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nat. Med.* 1995; 1: 944-949.

<sup>112</sup> Smith M.R., Nelson J.B.: Future therapies in hormone-refractory prostate cancer. *Urology*. 2005; 65(5):9-16.

<sup>113</sup> Bagnato A, Salani D, Di Castro V, Wu-Wong JR, Tecce R, Nicotra MR, Venuti A, Natali PG.: Expression of endothelin 1 and endothelin A receptor in ovarian carcinoma: evidence for an autocrine role in tumor growth. *Cancer Res.* 1999;59(3):720-727.

---

<sup>114</sup> Wulfing P., Diallo R., Kersting C., Wulfing C., Poremba C., Rody A., Greb R.R., Bocker W., Kiesel L.: Expression of endothelin-1, endothelin-A, and endothelin-B receptor in human breast cancer and correlation with long-term follow-up. *Clin. Cancer Res.* 2003;9(11):4125-4131.

<sup>115</sup> Wulfing P., Tio J., Kersting C., Sonntag B., Buerger H., Wulfing C., Euler U., Boecker W., Tulusan A.H., Kiesel L.: Expression of endothelin-A-receptor predicts unfavourable response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Br. J. Cancer.* 2004; 91(3):434-440.

<sup>116</sup> Wulfing C., Eltze E., Piechota H., Abol-Enein H., Wulfing P., Bode M.E., Hertle L., Sievert K.D.: Expression of endothelin-1 and endothelin-A and -B receptors in invasive bladder cancer. *Oncol. Rep.* 2005; 13(2):223-228.

<sup>117</sup> Wulfing C., Eltze E., Yamini J., Wulfing P., Bierer S., Bocker W., Hertle L., Semjonow A., Sievert K.D.: Expression of the endothelin axis in bladder cancer: relationship to clinicopathologic parameters and long-term survival. *Eur. Urol.* 2005; 47(5):593-600.

<sup>118</sup> Ishibashi I., Hanyu N., Nakada K., Suzuki Y., Yamamoto T., Takahashi T., Kawasaki N., Kawakami M., Matsushima M., Urashima M.: Endothelin protein expression as a significant prognostic factor in oesophageal squamous cell carcinoma. *Eur. J. Cancer* 2003; 39:1409-1415.

<sup>119</sup> Kaplan E.L., Maier P.: Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.* 1958; 53:457-481.

<sup>120</sup> Mantel N.: Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother. Rep.* 1966; 50: 163-170.

<sup>121</sup> Bagnato A., Natali P.G.: Targeting endothelin axis in cancer. *Cancer Treat Res.* 2004;119:293-314.

<sup>122</sup> Rossano L., Spinella F., Genovesi G., Di Castro V., Natali P.G., Bagnato A.: Endothelin-B Receptor Blockade Inhibits Molecular Effectors of Melanoma Cell Progression. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2004;44:S136-S139.



---

## *Ringraziamenti*

*Un doveroso ringraziamento a tutti coloro che hanno contribuito alla realizzazione di questo lavoro, in particolare la Dott.ssa Elke Eltze, per la costante collaborazione ed il prezioso aiuto, il Prof. Ralph Lellè per l'entusiasmo trasmessomi e l'incoraggiamento continuo, il Prof. Tiziano Maggino per la sempre cordiale disponibilità ed infine la Prof.ssa Paola Arlsan per il prezioso appoggio.*

*Un ringraziamento particolare a frau Alexandra Woltering per la gentilezza e la simpatia e per tutto l'aiuto logistico datomi durante la permanenza a Münster, ed a tutto il personale tecnico ed infermieristico della Frauenklinik e dell'Istitut für Pathologie per la cortesia e la professionalità dimostrata.*

*Vorrei soprattutto ringraziare Maria Verena per aver sempre creduto in me e di non aver mai smesso di sostenermi, di incoraggiarmi e di aiutarmi, non solo per la realizzazione di questo lavoro, ma sempre.*

*L'aiuto ed il supporto della mia Famiglia è stato fondamentale, senza il quale non sarei giunto alla conclusione di questo ciclo di studi.*