



Università degli Studi del Piemonte Orientale

"Amedeo Avogadro"

Facoltà di Medicina e Chirurgia, Novara

Dottorato di ricerca in Medicina Molecolare
ciclo XVII

Relazione annuale, A.A. 2003/2004, III Anno

**DEFINIZIONE DEL RUOLO DIAGNOSTICO E PROGNOSTICO DEL
MARKER TUMORALE TELOMERASI NELLE NEOPLASIE POLMONARI.
CORRELAZIONE TRA CHEMIOTERAPIA ED ATTIVITÀ DELLA
TELOMERASI IN CAMPIONI BIOLOGICI**

Tutors: Prof. Ilario Viano

Dott. Donato Colangelo

Dottoranda: **Annalisa Ghiglia**

Questo progetto, nato nel 2001, è realizzato e continua a svilupparsi grazie alla collaborazione con i reparti clinici dell'Ospedale "Maggiore della Carità" di Novara, di:

- Pneumologia (Dott. P. Balbo)
- Clinica Universitaria di Chirurgia Generale ed Anatomia Patologica (Prof. G. Monga)
- Oncologia (Prof. O. Alabiso)

INTRODUZIONE: LA NEOPLASIA POLMONARE

EPIDEMIOLOGIA DELLE NEOPLASIE POLMONARI

Incidenza e mortalità: il carcinoma polmonare è attualmente la neoplasia più frequente nella popolazione mondiale con una percentuale di crescita dello 0.5% l'anno ed è la 1° causa di morte per cancro nei paesi industrializzati (1.200.000 morti nel 2001; 40000 morti/anno in Italia) (*American Cancer Society, 2002; Jamal et al., 2002; Alberg et al., 2003*). In Europa rappresenta il 21% delle neoplasie riscontrate nel ♂ (4% nelle ♀) ed il 29% di tutti i decessi per cancro nel ♂ (8% nelle ♀). L'incidenza annuale in Europa e negli Stati Uniti è circa di 70 casi per 100000 abitanti. I tassi di incidenza maggiori in assoluto riguardano alcune popolazioni indigene della parte occidentale della Scozia, della Nuova Zelanda, dei neri Americani della zona della Baia di San Francisco e degli ♂ del Belgio. I tassi di incidenza più bassi si osservano in India e nelle popolazioni Africane. In Europa l'incidenza minore negli ♂ si osserva in Portogallo, Spagna e Francia mentre i più elevati in Belgio, Olanda, Gran Bretagna e Lussemburgo. La tendenza nella maggior parte degli Stati membri dell'Unione è per un aumento di incidenza del 10-15% ogni 5 anni negli ♂ e del 15-30% nelle ♀ (*Janssen-Heijnen et Coebergh, 2003*). Il picco di incidenza non era stato ancora raggiunto dalle ♀ nel 1990. In Italia si raggiungono percentuali che si collocano ai livelli medio-alti europei, con ampie differenze regionali (altissimo rischio per regioni del nord e medio-basso per il sud) e l'incidenza continua ad aumentare. Il carcinoma polmonare ha massima incidenza tra la 5° e la 7° decade di vita. Alla diagnosi l'età media dei pazienti è di 60 anni; oltre 1/3 dei nuovi casi è diagnosticato in soggetti di età superiore ai 70 anni. Il carcinoma polmonare rappresenta la 1° causa di morte per tumore nell' ♂ e la seconda nelle ♀, con un valore di mortalità sempre sovrapponibile all'incidenza. Nell' ♂ la mortalità per cancro del polmone è scesa significativamente (-1.6% ~ all'anno) nel periodo 1991-1995 ed ad oggi si ritiene stazionaria a livello mondiale, mentre è aumentata nelle ♀ dal 1987 (del 150% tra il 1974 e 1994, vs 20% degli ♂) ed appare in continua forte crescita (*Tyczynski et al., 2003*). La prognosi complessiva per pazienti con NSCLC, nonostante un miglioramento sia nella diagnosi che nel trattamento, risulta minimamente migliorata, mentre l'introduzione dal 1970 di schemi chemioterapici e la loro ottimizzazione ha incrementato il tempo di sopravvivenza per pazienti di SCLC (*Janssen-Heijnen et Coebergh, 2003*). Si è ottenuto solo un lieve aumento della sopravvivenza negli ultimi 30 anni. Negli Stati Uniti, infatti, solo il 15.8% dei pazienti

sopravvivono a 5 anni dalla diagnosi rispetto al 12% registrato nel 1973-80 (*Centers of Disease Control and Prevention, 2000*).

Fattori di Rischio: l'eziopatogenesi è multifattoriale. Esistono fattori predisponenti allo sviluppo di malattia, tra cui:

- **Tabagismo** (correla con ~ 90% dei tumori polmonari nel ♂ e 80% nella ♀):
- ❖ Esiste una chiara correlazione dose-risposta tra il rischio di sviluppare neoplasia polmonare e il n° (ed il tipo) di sigarette fumate/die, il grado di inalazione del fumo e soprattutto da quanto tempo si fuma (*Fano et al., 2004; Crispo, 2004*). Il cancro polmonare compare da 2 a 10 volte più frequentemente nei fumatori che nei non fumatori. Occorrono almeno 10 anni di astinenza dal fumo perché il rischio dell'ex-fumatore si dimezzi. Il rischio legato al fumo di pipa e sigaro è ~ 3 volte < rispetto a quello della sigaretta.
- ❖ Il fumo di sigaretta **augmenta la probabilità di sviluppo di qualsiasi tipo istologico di neoplasia polmonare** ma in particolare di tumori a cellule squamose e di SCLC. Le alterazioni istologiche, pressoché esclusive nei fumatori, consistono nella perdita delle ciglia della mucosa bronchiale, nell'iperplasia delle cellule basali e nella presenza di cellule atipiche (nuclei ipercromatici). Il fumo compromette la funzione di trasporto muco-cigliare, riduce il potere fagocitario dei macrofagi, la risposta anticorpale ed interferisce sulla funzionalità dei linfociti T. Questo rischio pare essere simile nel ♀ e ♂ con esposizione a equivalenti quantità di fumo di tabacco (*Tyczynski et al., 2003*).
- **Fumo Passivo:**
- ❖ può risultare dalle esalazioni a partire da chi fuma o dal fumo che origina secondariamente dalla combustione dei prodotti del tabacco (sigarette, sigari e pipe). Queste esalazioni hanno un'alta concentrazione di composti cancerogeni rispetto al fumo espirato. Il posto di lavoro (ufficio) è stato individuato come sorgente più comune di esposizione ambientale al fumo di tabacco (*Veglia et al., 2003*).
- ❖ Si stima che l'esposizione ambientale al fumo di tabacco aumenti il rischio del 15-25%, anche tenendo conto di possibili fattori di confondimento (*Tyczynski et al., 2003*).
- ❖ Questo tipo di esposizione sembra **augmentare il rischio per carcinoma squamocellulare** più del rischio per adenocarcinoma o SCLC (*Papi et al., 2004*).
- ❖ Le sostanze cancerogene contenute nella fase corpuscolata e gassosa del fumo di tabacco sono:
 - idrocarburi aromatici policiclici: 3,4-benzopirene soprattutto, che origina dalla combustione della sigaretta
 - nitrosamine: note per la loro azione cancerogena, si formano dalla conservazione, fermentazione e combustione del tabacco ed agiscono soprattutto sull'esofago

- amine aromatiche: agiscono soprattutto sulla vescica
- composti dell'arsenico: derivano dagli antiparassitari usati nelle piantagioni del tabacco
- composti contenenti nickel e cromo
- composti radioattivi: derivano dai fertilizzanti fosfatici usati nella coltivazione del tabacco
- radicali tossici dell'ossigeno

Il danno derivante da questo tipo di sostanze sembra esplicarsi direttamente sul DNA cellulare. Le dimensioni delle particelle del tabacco raggiungono un massimo di 0.1 micron, potendo così raggiungere le parti più distali dell'albero respiratorio. Il fumo di sigaretta modifica l'equilibrio tra le diverse attività enzimatiche nel tessuto polmonare aumentando l'attività di enzimi (es. aril-idrocarburo-idrossilasi) che favoriscono l'insorgenza del tumore o inibendone altri con funzione protettiva (es. glutatione transferasi).

- **Fattori genetici (predisposizioni ereditarie ed anomalie genetiche)**: sono responsabili di un'ampia variabilità di suscettibilità allo sviluppo del tumore polmonare nella popolazione. Non è infrequente la comparsa di una nuova neoformazione polmonare a qualche anno di distanza da un primo episodio trattato radicalmente con la chirurgia. Così pure sono osservabili cancro bronchiali in pazienti che hanno già avuto un altro tumore delle vie aeree (laringe) o in altra sede (21% dei casi) (*Buccheri et Ferrigno, 2004*). Studi epidemiologici hanno dimostrato una maggiore incidenza in alcune famiglie. Una predisposizione genetica è stata individuata in un'aumentata inducibilità, nei linfociti di pazienti portatori di carcinoma broncogeno, di un enzima di membrana, la aril-idrocarburo-idrossilasi che attiverebbe alcuni cancerogeni chimici presenti nell'atmosfera. Lo stesso meccanismo è stato dimostrato per l'enzima 4-debrisochina-idrossilasi la cui iperattività risulta associata a maggior rischio di sviluppo di tumore polmonare. Sono state identificate mutazioni genetiche in geni soppressori tumorali inattivati (*p53* e *pRB*: se entrambe mutati le aspettative di sopravvivenza sono di soli 12 mesi vs i 46 mesi dei pazienti *wilde-type*; nel 50% dei NSCLC e nel 90% dei SCLC si registrano alterazioni del gene *p53*) e oncogeni attivati (*K-ras*, la cui mutazione rappresenta il 90% delle anomalie genetiche negli adenocarcinomi ed è associata a bassa prospettiva di sopravvivenza; *erb-B* nei NSCLC; *c-myc* nei SCLC) (*Fong et al., 2003*) così come alterazioni molecolari (*Kijima et al., 2003*). Individui portatori di una deficienza allelica di alfa 1-antitripsina hanno dimostrato un rischio maggiore di sviluppo di tumore polmonare, specificamente di tipo squamoso o broncoalveolare (*Yang et al., 1999*).
- **Malattie polmonari pregresse**: sono noti cancro da cicatrice che insorgono sugli esiti fibrotici di processi tubercolari guariti, sugli esiti di infarto polmonare, su cicatrici secondarie a corpi estranei

metallici, a ferite. Tali cancro, denominati *ex cicatrice*, istologicamente spesso risultano adenocarcinomi. Anche i bronchitici cronici sono più frequentemente colpiti da cancro bronchiale. Uno studio su pazienti fumatori operati di NSCLC ha evidenziato come la malattia polmonare cronica ostruttiva (COPD) sia un fattore di rischio per il sottotipo istologico a cellule squamose, mentre la bronchite cronica, specialmente quando non associata a COPD, sia un fattore di rischio per l'adenocarcinoma (Viegi et al., 2001; Papi et al., 2004). Uno studio di follow-up di casi NSCLC allo stadio I, operati e liberi da tumore dopo 5 anni, ha dimostrato come questi pazienti abbiano un'incidenza di nuovi tumori polmonari maggiore rispetto alla popolazione generale (Pasini et al., 2003). Non è chiaro se la malattia interstiziale polmonare, un disordine fibrotico di diverso grado che interessa gli alveoli polmonari, preceda o sia conseguenza di tumore polmonare (Raghu et al., 2004).

- **Dieta:** l'alcool, il cui consumo è spesso associato al fumo, è considerato un fattore predisponente. Il ruolo eziologico degli alimenti in questo tipo di patologia è ancora oggetto di studio: le nitrosamine, note sostanze cancerogene, sono presenti in molti additivi alimentari e la carenza di vitamina A è in grado di provocare una metaplasia squamosa della mucosa tracheobronchiale (Nosenzo et Tassi, 2000).
- **Esposizione ad altri carcinogeni ambientali ed occupazionali:** es. l'esposizione professionale all'asbesto (aumento del 40% dell'incidenza di tumore nei ♀ e 20% nelle ♀, con esordio anche dopo 30 anni dall'esposizione), ad alcuni metalli come il nickel, l'arsenico, il cadmio, il cromo, l'esposizione al radon (Jarup, 2003). Sono certamente cancerogeni i minerali radioattivi (uranio, radio, torio, plutonio) con segnalazioni di incidenze altissime di cancro polmonare in miniere nelle quali vi era, insospettato, un materiale radioattivo. Anche le radiazioni ionizzanti possono favorire l'insorgenza di un carcinoma. L'effetto di alcune di queste sostanze sul rischio di sviluppo di un tumore polmonare potrebbe essere sinergico all'effetto del fumo (sinergia accertata per l'asbesto con un aumento del rischio di 20 volte nei fumatori) (Mollo et al., 2002; Fano et al., 2004; Degiovanni et al., 2004; Savastano et al., 2004). Uno studio ha evidenziato un'associazione tra la presenza di radon in zone alpine italiane ed il tumore polmonare in ♀ fumatori (Pisa et al., 2001). L'incidenza di neoplasie polmonari negli abitanti di zone urbane risulta 2-3 volte superiore rispetto a quella degli abitanti delle zone rurali, in conseguenza soprattutto della maggiore esposizione dei primi ad inquinamento atmosferico (idrocarburi aromatici, es. benzopirene). Studi italiani su fattori di rischio occupazionali hanno evidenziato esposizioni a cancerogeni polmonari in differenti tipi di lavoro svolti da ♀ rispetto agli ♂ (Richiardi et al., 2004). In generale, il contributo dei fattori ambientali allo sviluppo di neoplasie polmonari è ridotto.

Prevenzione Primaria : mira ad impedire l'inizio biologico della neoplasia con due possibili strategie:

1. controllo del consumo di sigarette: compare come prima regola del *Decalogo Europeo Contro il Cancro* in vigore dal 1995, chiaro esempio di prevenzione primaria. Il rischio di ammalarsi per una neoplasia polmonare si riduce progressivamente con l'aumentare del tempo trascorso senza fumare (Hirsch, 1998). Il programma di controllo del tabacco iniziato nel 1988 in California ha condotto ad un declino dell'abitudine al fumo e conseguentemente alla diminuzione dell'incidenza del tumore polmonare (Barnoya et Glantz, 2004).
2. chemioprevenzione: si basa sullo studio di composti naturali o sintetici che sembrano dotati di proprietà anticancerogene (prevalentemente antiossidanti), prevenendo l'iniziazione, la promozione e la progressione delle neoplasie prima dello sviluppo di malattia invasiva (Cohen et Khuri, 2004; Winterhalder et al., 2004). I retinoidi ne sono un esempio, in particolare l'acido 13-*cis*-retinoico e la fenretinide (Soria et al., 2003). Studi hanno dimostrato l'assenza di benefici dal trattamento con β -carotene per la prevenzione del tumore polmonare (Gescher et al., 2001; Tyczynski et al., 2003). Altre molecole sono l'N-acetil-L-cisteina, oltipraz e il fenetil isotiocianato (che inducono enzimi detossificanti), folati, selenio, l' **N-4-idrossifenilretinamide (che sembra ridurre l'espressione della telomerasi nei fumatori)** (Szarka et al., 1994; Soria et al., 2001; Bowman et al., 2002), inibitori della COX e la budesonide (un glicocorticoide) (Wattenberg et al., 2000; Hirsch, 1997; Pastorino, 2001).

Prevenzione Secondaria: Screening: definibile come un intervento di Sanità Pubblica che mira alla **diagnosi precoce** di malattia in pazienti ancora asintomatici (Boyle, 2002 ; Strass et Dominioni, 1999). Come per la prevenzione primaria anche per la secondaria il *Decalogo Europeo Contro il Cancro* detta norme generali. La storia naturale della malattia neoplastica può essere esemplificata dal **modello di Hutchinson (Figura1)**, secondo cui è possibile descrivere l'andamento della malattia neoplastica secondo alcuni momenti fondamentali:

- **T1**: evento fondamentale è la comparsa del danno biologico che ad oggi, con le tecniche diagnostiche convenzionali, non è dimostrabile
- **T2**: la neoplasia è potenzialmente rilevabile con l'esecuzione di opportune indagini, ma non è sintomatica
- **T3**: la neoplasia è sintomatica
- **T4**: esito finale o decesso del paziente

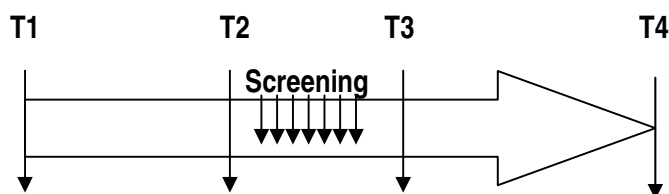


Figura 1. Il Modello di Hutchinson

- **Punto Critico:** è il momento oltre il quale qualsiasi intervento terapeutico applicato non può portare a guarigione il paziente. Se questo è localizzato tra T1 e T2 la diagnosi precoce non è in grado di modificare la prognosi, se tra T3 e T4 la diagnostica convenzionale può essere sufficiente a modificare l'andamento della malattia. Condizione essenziale per la attuazione di una prevenzione secondaria efficace è che il punto critico sia localizzato tra T2 e T3.

Con un test di screening si ottiene un'anticipazione diagnostica (definita come differenza tra il momento della diagnosi con lo screening e il tempo T3) che, rifacendosi al modello di Hutchinson, consiste nello spostamento del momento diagnostico da T3 a T2. Ad oggi **non esiste un programma di screening per la diagnosi precoce di una neoplasia polmonare** anche se sono in corso molti studi per realizzarlo (*Humphrey et al., 2004*). **Solo sporadicamente e spesso casualmente si ottengono diagnosi precoci di tumore polmonare** (*Henschke et al., 1999*). Una maggiore attenzione ai **sintomi e segni precoci (d'allarme)** caratteristici della crescita bronchiale della neoplasia permetterebbe di effettuare diagnosi più tempestive. Il trattamento più efficace di una neoplasia polmonare rimane la resezione chirurgica ad uno stadio iniziale di malattia (*Bach et al., 2003*). Un test di screening è fortemente auspicabile per il trattamento in fase preclinica della neoplasia polmonare e per modificarne la storia naturale, finora estremamente infausta. Si stima, infatti, che la sopravvivenza a 5 anni sia superiore all'80 % quando la neoplasia polmonare viene asportata chirurgicamente prima che raggiunga un diametro di 20 mm (*Patz et al., 2000*). Uno studio recente a tal riguardo ha dimostrato come la dimensione del tumore sia un fattore predittivo della sopravvivenza in casi di NSCLC allo stadio IA, con una probabilità di sopravvivenza a 5 anni pari al 77,2% per tumori ≤ 2 cm e 60.3% se > 2 cm (*Port et al., 2003*).

Gli studi condotti sino ad oggi si sono focalizzati sull'applicazione come tecniche di screening di:

1. esame radiografico del torace (RX) tradizionale: talvolta non evidenzia il tumore polmonare che può nascondersi come una piccola ombra dietro le costole o strutture vascolari del mediastino ma può evidenziare comunque numerose alterazioni conseguenti alla presenza di neoplasia (un versamento pleurico, linfonodi ingrossati, una polmonite, metastasi nella porzione superiore del fegato). Una tecnologia più recente permette di non evidenziare le ossa del torace, fotografando solo il tessuto polmonare con maggiore facilità della lettura delle immagini. Ha un'accuratezza diagnostica del 70-88% in pazienti sintomatici.

2. citologia dell'escreato.

I risultati di 5 studi randomizzati [1 a Londra 1960-1964; 3 negli Stati Uniti, avviati agli inizi degli anni '70: Lung Projects della Mayo Clinic, Johns Hopkins Hospital e Memorial Sloan-Kettering Cancer Center

(MSKCC), 1 in Cecoslovacchia 1976-1980] suggeriscono che né la RX standard del torace, né la citologia dell'escreato soddisfano i criteri richiesti per un efficace test di screening. Nessuna di queste indagini sembra prolungare l'aspettativa di vita di una persona affetta da neoplasia polmonare. La bassa sensibilità di entrambe le metodiche nei confronti di neoplasie in fase preclinica è una delle ragioni che hanno portato al fallimento degli studi condotti (*Bach et al., 2003*).

3.a. TC spirale a bassa emissione: tecnica radiologica estremamente sensibile nel rilevare piccole neoformazioni nodulari polmonari che sono la forma più comune di presentazione iniziale di un tumore. Sono individuabili lesioni con diametro massimo anche di 3 mm (*Van Klaveren et al., 2001 et 2002; Henschke et al., 2004*). Poiché il riscontro di piccoli noduli polmonari è un'evenienza comune e poiché molti di questi sono lesioni benigne, la densità della neoformazione, la sua dimensione e la valutazione della eventuale crescita nel tempo devono essere di ausilio nella valutazione della TC in esame. Una lesione con diametro superiore a 5 mm e con tempo di raddoppiamento minore di 180 giorni è fortemente suggestiva di malignità e può dare indicazioni per l'esecuzione di esami più invasivi. Si è dimostrata la capacità di questa metodica di evidenziare molte neoplasie ancora asintomatiche, piccole, consentendo la loro precoce resezione chirurgica. L'accuratezza diagnostica totale è del 43-97% se la lesione è visibile fluoroscopicamente. La tecnologia è recente e solo da poco sono stati condotti studi osservazionali specifici sul suo uso nello screening per il tumore polmonare [l'Early Lung Cancer Action Project (ELCAP) americano; l'Anti Lung Cancer Association (ALCA) e il Shinshu, entrambe giapponesi] (*Bach et al., 2003; Diederich et al., 2003; Port et al., 2002*). L'incidenza della neoplasia polmonare in questi studi è più bassa della prevalenza, come ci si aspetta da uno screening efficace. La percentuale di NSCLC allo stadio I, tra tutte le neoplasie riscontrate, era compresa tra l' 82% e l' 88%. Occorrono dati derivanti da studi caso-controllo randomizzati, il miglior strumento per dimostrare una possibile riduzione della mortalità di uno screening, oggi in via di attuazione.

3. b. TC spirale e Tomografia ad emissione di positroni (PET) : la PET è una tecnica diagnostica medico-nucleare che utilizza radioisotopi emettenti positroni (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F) che possono essere incorporati dai composti organici senza alterarne le caratteristiche biochimiche. Lo studio ha dimostrato che la TC spirale in combinazione con l'uso selettivo della PET può effettivamente diagnosticare precocemente la neoplasia polmonare (*Pastorino et al., 2003; Giorgietti et al., 2002; Gould et al., 2001*). Uno studio recente ha confermato questi dati indicando come l'integrazione della PET-TC, utilizzando FDG-18 (2-[^{18}F]-fluoro-2-deossi-D-glucosio), predica con maggiore sensibilità gli stadi I e II così come lo stato T ed N di pazienti con NSCLC rispetto alla PET da sola (*Cerfolio et al., 2004*). La tecnologia della PET è impiegata principalmente come strumento di stadiazione di pazienti con NSCLC (individua gruppi di cellule maligne che si dividono rapidamente e di dimensioni tali da essere invisibili all' RX, alla TAC o

alla RMN) piuttosto che come strumento di diagnosi. Questa tecnica comunque ha portato alla riduzione dei costi complessivi di diagnosi per ogni anno, riducendo il numero di interventi chirurgici non necessari e le loro complicanze (*Gugiatti et al., 2004*).

Prevenzione Terziaria: riguarda le possibilità terapeutiche del tumore polmonare (vd. oltre: **TERAPIA:** chirurgia, chemioterapia, radioterapia) ed il controllo delle eventuali recidive dopo una cura efficace.

ANATOMIA PATOLOGICA DELLE NEOPLASIE POLMONARI

Microscopicamente si distinguono:

1. **Tumori Centrali o dei grandi bronchi:** la centralità della lesione determina il possibile interessamento mediastinico per infiltrazione neoplastica, con inglobamento di vasi, pericardio, vene cave e trachea.
2. **Tumori periferici** (originano dai segmenti distali delle vie aeree ossia da piccoli bronchi, bronchioli e alveoli): l'insorgenza della neoplasia è caratterizzata dall'assenza di indizi macroscopici evidenti sulla mucosa bronchiale. Appaiono come masse globose con limiti netti col parenchima circostante.
3. **Tumori diffusi** (talora quadri evolutivi avanzati di tumori primitivamente centrali o periferici): macroscopico interessamento di ampie regioni polmonari di ordine lobare o sovralobare.

Osservazioni epidemiologiche indicano che i tumori centrali rappresentano circa i 2/3 dei casi, con solo 1/3 di neoplasie periferiche. La casistica autoptica segnala ad oggi un graduale aumento di neoplasie periferiche.

Istotipi tumorali: la classificazione anatomo-patologica proposta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (**WHO, World Health Organization**) suddivide i tumori del polmone in (*Travis et al., 1999*):

- **Lesioni preinvasive: displasia, carcinoma *in situ***
- **Carcinoma a Piccole cellule (SCLC)-microcitoma:** *a cellule a chicco d'avena, a cellule intermedie (più voluminose), forma combinata (con elementi squamosi e ghiandolari)*. Rappresenta ~ il 25% delle neoplasie polmonari ed il 5-15% della casistica chirurgica (questa percentuale è molto bassa soprattutto perché questo tumore è clinicamente molto maligno e spesso non è più curabile al momento della diagnosi). L'aspetto microscopico caratteristico è quello di ammassi e lamine cellulari con limiti epitelio-stromali meno netti che nel carcinoma squamoso. Le cellule neoplastiche sono tondeggianti o allungate e di dimensioni di poco superiori a quelle di un linfocita (6-15 µm), con nuclei ovoidali o fusiformi scuri e scarso citoplasma (aspetto microscopico a *chicco d'avena*). L'atteggiamento è infiltrante, con necrosi e mitosi. Esistono granuli citoplasmatici di tipo neuroendocrino, visibili alla microscopia elettronica, infatti le cellule originerebbero dalla cresta neurale embrionale e farebbero parte del sistema APUD, con possibilità di sintetizzare ormoni peptidergici. Nel siero dei pazienti è rilevabile la presenza dell'enzima enolasi neurono-specifica

(NSE). Solitamente non si riscontrano squilibri ormonali data la secrezione di sostanze inattive. E' possibile però l'insorgenza di sindromi legate alla secrezione ectopica di ormoni quali ACTH (ormone adreno-corticotropo), calcitonina, vasopressina. Macroscopicamente è un tumore a localizzazione prevalentemente centrale (80%), ilare o parailare. Precocemente manifesta coinvolgimento linfonodale, con adenopatia ilo-mediastinica evidente spesso alla diagnosi. La sua diffusione per via ematica è rapida con embolizzazione diffusa e quadri di carcinosi generalizzata. Questo istotipo è associato ad alterazioni cromosomiche multiple (la più frequente risulta la delezione 3p), alla iperespressione di recettori di superficie (es. tirosina chinasi), recettori accoppiati a proteine G, integrine ed altri (*Sattler et Salgia, 2003*). Risulta frequente nei fumatori ed ex-fumatori (solo il 3% sono non fumatori) ed è caratterizzato da frequente e rapida metastatizzazione, soprattutto a carico del midollo osseo e del cervello, e bassa risposta alla chemioterapia (risposta completa nel 30% dei casi) con sopravvivenza a 5 anni solo del 5% (di poco più alta nei pazienti con malattia limitata). Ogni 30gg può raddoppiare la propria dimensione, quindi con velocità di molto superiore rispetto al NSCLC.

- **Carcinoma Squamocellulare (epidermoidale, spinocellulare) (NSCLC):** *papillare, a cellule chiare, a piccole cellule, basaloide*; altamente, moderatamente o scarsamente differenziato. Rappresenta il 30% delle neoplasie polmonari ed il 30-40% della casistica chirurgica. Le cellule, disposte in lamine su più strati variamente irregolari a costituire un epitelio pavimentoso, hanno forma poligonale, fusata, i nuclei grandi (aumento del rapporto nucleo-citoplasma) con nucleoli evidenti, e nelle forme più differenziate sono presenti tonofibrille e/o segni di corneificazione con vere e proprie perle cornee. È frequente l'osservazione di necrosi centrale e di cavitazione. Questo tipo di tumore, più comunemente di altri, è responsabile di sindromi paraneoplastiche da produzione di peptide paratormone-simile. La sua presentazione macroscopica più frequente (65%) è quella del tumore centrale, ilare e tende ad espandersi contro la parete bronchiale determinando una compressione estrinseca. Si accresce abbastanza lentamente e in alcuni casi è stato possibile valutare un tempo di raddoppiamento della massa tumorale molto lungo, di ~ 200 giorni. La metastatizzazione, più tardiva rispetto all'adenocarcinoma, interessa più frequente i linfonodi regionali (lobari, ilari, mediastinici), ma anche la diffusione ematica è possibile. La presenza di questo tipo di tumore può essere riscontrata con relativa facilità con l'esame citologico dell'escreato. E' l'istotipo maggiormente associato con l'abitudine al fumo, ha la più bassa risposta alla chemioterapia ma guarisce meglio di tutti gli altri istotipi dopo intervento chirurgico. Si riscontra più frequentemente negli ♂ e nelle persone anziane di entrambe i sessi.

- **Adenocarcinoma (NSCLC):** *acinoso, papillare, carcinoma bronchiolo-alveolare (non-mucinoso, mucinoso, combinato), solido con mucina, adenocarcinoma comprendente sottotipi misti (fetale, mucinoso, cistoadenocarcinoma mucinoso, ad anello, a cellule chiare)*. Rappresenta ~ il 40% delle neoplasie polmonari e nelle casistiche chirurgiche ha una frequenza pari a ~ 35 %. Le cellule tumorali, cubiche o colonnari con abbondante citoplasma roseo o vacuolato, hanno origine dall'epitelio di superficie o dalle ghiandole della mucosa bronchiale e formano strutture ghiandolari con o senza produzione di muco ("catarro"). Talora sono evidenti cellule ad anello con castone (nucleo in periferia e muco abbondante nel citoplasma). Abbastanza frequente è il riscontro di **forme miste adenosquamose**. Nella sua forma ben differenziata predomina il sottotipo cellulare denominato cellule di Clara (*Fujiwara et al., 2000*). La sede di sviluppo preferenziale è periferica (con partenza dai piccoli bronchi e a volte dagli alveoli), localizzazione che ne permette l'asintomatologia anche per lungo tempo e la scoperta talora casuale. L'aspetto macroscopico è quello di una massa rotondeggiante di volume solitamente modesto e per questo clinicamente asintomatico. Oltre alla metastatizzazione linfatica, dà metastasi per via ematica e talvolta queste localizzazioni secondarie sono responsabili dei primi sintomi di malattia, comunque tende a metastatizzare più precocemente rispetto al carcinoma squamoso. Rispetto a quest'ultimo, inoltre, risulta più responsivo alla chemioterapia ma più difficile da curare chirurgicamente. E' il tumore meno legato all'abitudine al fumo e quindi è abbastanza frequente nelle ♀ e nei non fumatori (*Nordquist et al., 2004*).
- ❖ **Carcinoma Bronchiolo-alveolare:** piuttosto raro (2.5 % del totale), viene incluso tra le **varianti istologiche di un adenocarcinoma** (*Nakanishi et al., 2003*). Si ipotizza che le cellule neoplastiche possano derivare dell'epitelio bronchiolare, dalle cellule alveolari di tipo II, dalle cellule di Clara o dall'epitelio bronchiale muco-secerente. Si sviluppa lentamente e la lesione più precoce riconoscibile risulta un'iperplasia adenomatosa atipica, telomerasi positiva (*Kitamura et al., 1999; Nakanishi et al., 2002*). Istologicamente si osservano cellule cubiche che rivestono gli alveoli, i cui setti appaiono conservati. Tali cellule disposte in fila si sollevano a volte a formare papille o pseudocisti ripiene di muco. La scarsità di mitosi e l'assenza di distruzione dell'impalcatura del polmone l'aveva fatto ritenere in passato un tumore relativamente benigno, invece si tratta di un vero e proprio carcinoma. Macroscopicamente si presentano come forme di tipo diffuso, il cui aspetto radiologico è molto simile a quello di una broncopolmonite. Il tumore è caratterizzato dall'estensione lobare senza netta delimitazione e ha insorgenza multifocale. Dopo la sua resezione non è raro assistere alla recidiva nello stesso polmone o in quello controlaterale. Raramente dà metastasi ma ha prognosi infausta.

- **Carcinoma a Grandi cellule (anaplastico) (NSCLC):** *neuroendocrino a grandi cellule, basalioido, linfoepitelioma-simile, a cellule chiare*. Rappresenta il 15 % dei tumori polmonari e, per la sua aggressività, è l'istotipo di più raro riscontro nelle casistiche chirurgiche (5-15 %). Raggruppa le forme più polimorfe di neoplasie, con cellule voluminose con abbondante citoplasma e nuclei molto irregolari, vescicolari o ipercromici, disposte in accumuli o isole, mancando in questa forma le caratteristiche citologiche specifiche dei carcinomi squamosi e degli adenocarcinomi. La divisione nelle due varianti, a cellule giganti e a cellule chiare, non ha significato clinico. Sono anaplastici in genere i grossi tumori a palla e quelli vegetanti nei bronchi segmentari. Uno stato di differenziazione buono correla con una prognosi migliore. L'accrescimento è abbastanza rapido con tendenza infiltrante su ilo e mediastino e si sviluppa tendenzialmente alla periferia. Si valuta, per un cancro anaplastico, un tempo di raddoppiamento di circa 60-80 giorni. Metastatizza sia per via linfatica che ematica con maggior frequenza rispetto al carcinoma squamocellulare. E' frequente nei fumatori.
- **Carcinoma Adenosquamoso (NSCLC)**
- **Carcinoma con elementi pleomorfici, sarcomatosi o sarcomatoidi**
- **Tumore Carcinoide:** *tipico (90%), atipico (10%)*. I tumori carcinoidei, forma rara di cancro (1-5% delle diagnosi di tumore polmonare), possono originare in diverse parti del corpo ed i bronchi sono al 4° posto nella scala dei siti più frequenti. Può essere considerato come tumore bronco-polmonare a lento sviluppo e di relativa benignità, pur con possibilità di metastatizzazione a distanza. Deriva dalle cellule di Kulchitzky, originate dalla cresta neurale e sparse in tutti i tessuti derivati dal primitivo canale endotermico (intestino e albero tracheo-bronchiale). Sono cellule con capacità di sintesi ormonale ed i tumori che ne derivano rientrano nel gruppo degli Apudomi, più o meno ormono-secerenti. Microscopicamente il tumore appare formato da cordoni, palizzate e rosette di cellule piccole, con nucleo rotondo e regolare e caratterizzate dalla presenza di granuli citoplasmatici di tipo neuroendocrino. La maggior parte esprime enolasi neurono-specifica (NSE) e cromogranina A. Le mitosi sono scarse e la necrosi è assente. Nel complesso il tessuto polmonare mantiene la sua identità, la struttura istologica è mantenuta. Solitamente appare come una vegetazione moriforme, facilmente sanguinante, che sporge in un bronco lobare o segmentario. E' una neoplasia che può secernere serotonina (5% dei casi), più evidentemente quando il tumore è voluminoso o vi sono grosse metastasi. Nelle forme "tipiche" le metastasi linfonodali sono presenti solo nel 10-15 % dei casi e non vi sono segni di invasività. Nelle forme "atipiche", nel 50% dei casi a sede periferica, si segnalano metastasi linfonodali (linfonodi ilari) o a distanza (fegato) nel 50-70 % dei casi. Nel complesso la prognosi è migliore (basso grado di malignità) rispetto ai carcinomi bronchiali. La

maggior parte dei pazienti a cui viene diagnosticato è asintomatica. L'intervento chirurgico è l'unica terapia attuabile mentre la chemioterapia e radioterapia sono utilizzati come rimedi palliativi.

- **Mesotelioma maligno:** rara forma di tumore che può originare in diverse parti del corpo ma che solitamente si sviluppa nella **pleura viscerale** che riveste i polmoni. È difficile da diagnosticare e raramente curabile. La sua classificazione in stadi è simile a quella per NSCLC. La sua causa principale è l'inalazione di polvere di amianto, con un tempo di latenza di 35-40 anni tra questo evento e la manifestazione dei sintomi. È più frequente nel ♂. Per l'alto tasso di recidive locali e sistemiche il solo intervento chirurgico non è efficace (tasso di sopravvivenza a 5 anni <1%). La polichemioterapia è simile a quella dei NSCLC mentre la radioterapia non è attuabile per la tossicità delle alte dosi dirette su un'area estesa.

Vie di diffusione :

1. **per contiguità agli organi e strutture vicine:** pleura viscerale e parietale, coste e muscoli intercostali, strutture del mediastino (grossi vasi venosi e pericardio), colonna vertebrale ed a livello diaframmatico.
2. **per via linfatica:** la linfa di un lobo affetto da cancro bronchiale viene drenata dai linfonodi lobari, in seguito da quelli ilari del polmone ed infine raggiunge i linfonodi mediastinici e successivamente quelli del collo e/o addome. Le metastasi possono essere presenti in linfonodi piccoli e assenti in linfonodi ingrossati e possono essere saltate delle stazioni. L'invasione metastatica di un linfonodo può essere all'inizio solo intranodale, con capsula integra e nodo non fissato ai tessuti circostanti. In seguito l'invasione può divenire extranodale con invasione della capsula e fissazione ai tessuti circostanti del linfonodo.
3. **per disseminazione ematogena:** le neoplasie con maggiore tendenza a dare precoci metastasi per via ematica sono il **carcinoma a piccole cellule e l'adenocarcinoma**. Le cellule tumorali trovano accesso al flusso ematico sistemico attraverso rami delle vene polmonari da cui gli emboli neoplastici possono raggiungere qualsiasi organo a distanza ma soprattutto **fegato, encefalo, ossa e ghiandole surrenali**. Quest'ultima localizzazione è molto frequente ed è sovente bilaterale. È stato dimostrato come il VEGF promuova la metastatizzazione ematogena in pazienti di NSCLC (*Dong et al., 2002*).
4. **per disseminazione intra-bronchiale (molto rara).**

LA DIAGNOSI

Elementi indispensabili per una corretta valutazione diagnostica di un paziente con sospetta neoplasia polmonare sono: **accurata anamnesi ed esame obiettivo del paziente, indagini radiologiche (Rx**

torace in due proiezioni), **procedure per prelievi cito-istologici di conferma diagnostica** (Nosenzo et Tassi, 2000).

Presentazione clinica : nel 15% dei casi la neoplasia è completamente asintomatica dando segno di sé solo quando raggiunge i grossi bronchi (causando tosse ed emoftoe), oppure la superficie pleurica (causando dolore). E' possibile che il paziente presenti inizialmente solo sintomi generali aspecifici, comuni anche a molte altre malattie. Al momento della diagnosi solo il 6% dei pazienti è asintomatico, il 28% presenta dei sintomi correlati al tumore primitivo (**sintomi precoci o di allarme**: 70% tosse, 35% emottisi, febbre, dispnea), il 32% legati alla malattia metastatica (**sintomi tardivi**, legati alla crescita endotoracica e diffusione metastatica ai linfonodi distrettuali: dolore toracico, disfagia, disforia, stridore tracheale,..) ed il 34% **di tipo sistemico** (legati a diffusione metastatica a distanza, ad altri organi quali cervello, fegato, surreni e ossa), spesso non specifici, che possono insospettire per l'esistenza di una neoplasia. Quindi i ~ 2/3 dei pazienti presenta un esordio clinico in fase tardiva con sintomi e segni loco-regionali e sistemici. Infine vanno ricordate le sindromi paraneoplastiche (*disturbi endocrini-metabolici, disturbi neuromuscolari, anomalità del tessuto connettivo, alterazioni cutanee e muscolari, alterazioni ematiche vascolari*), quadri patologici che apparentemente non hanno alcuna relazione con il tumore polmonare. Alcune sono causate spesso dalla secrezione ormonale peptidica da parte della cellula tumorale. Talvolta è possibile che la sindrome paraneoplastica si manifesti anche molto tempo prima rispetto alla comparsa della lesione polmonare. **L'istotipo tumorale maggiormente responsabile di sindromi paraneoplastiche è il SCLC.** In una piccola percentuale di pazienti (5-12%) l'iter diagnostico è innescato da un'anomalia rilevata da un Rx torace occasionale, eseguito per altro motivo.

Procedure per prelievi cito-istologici di conferma diagnostica: la conferma cito-istologica dell'esistenza di neoplasia è un dato indispensabile per conoscerne l'istotipo e il grado di malignità della neoplasia. Le informazioni ottenute giustificano la scelta di una specifica condotta terapeutica.

Esame citologico dell'escreato: si basa sulla possibilità di sfaldamento delle cellule neoplastiche entro le secrezioni bronchiali che vengono raccolte dal paziente, sotto colpi di tosse. Il supporto di questo dato citologico è ricercato soprattutto in caso di neoplasie polmonari centrali, quando è più probabile il diretto sfaldamento delle cellule nel lume bronchiale. Ha potere diagnostico in più del 20% di tutti i pazienti con tumore polmonare, risulta positivo in <5% di pazienti con cancro periferico e può dare falsi positivi.

Se gli esami obiettivi del paziente, le indagini RX, gli esami citologici dell'espettorato e gli esami ematochimici completi risultassero negativi, il paziente sarà seguito con controlli RX altrimenti, sia se positivi sia se dubbi, si dovrà ottenere conferma dagli esami TAC e Broncoscopia, con finalità diagnostiche e di studio della malattia.

- **Esame broncoscopico (fibrobroncoscopia):** è fondamentale nello studio di un paziente con sospetta neoplasia polmonare. Ha un potere diagnostico del 10% se la lesione è <2 cm, del 40-50% se >2-4 cm. L'accuratezza diagnostica totale per lesioni visibili è pari al 94%. È un esame endoscopico estremamente tollerabile, di facile esecuzione, ripetibile che non richiede anestesia generale e viene seguito con strumento flessibile e di piccolo calibro, che permette l'esplorazione dell'albero bronchiale sino ai rami segmentari e sottosegmentari. L'indagine permette di visualizzare direttamente la mucosa bronchiale ed evidenziarne eventuali alterazioni, compressioni estrinseche con ostruzione, erosioni o vegetazioni endoluminali in accrescimento. Risulta quindi in grado di confermare la diagnosi di neoplasia, di escludere secondi tumori endobronchiali primitivi e di accertare l'exeresi completa del tumore dopo resezione chirurgica. L'impiego della **broncoscopia a fluorescenza** dopo iniezione endovenosa di derivati dell'ematoporfirina permette di localizzare i cancri *in situ* e le forme superficiali. Il materiale ottenibile in corso di broncoscopia deriva da:
- ❖ **Biopsie bronchiali:** frammenti di tessuto patologico aggettante nel lume bronchiale, vengono prelevati con pinza da biopsia. Il materiale viene posto in formalina per la successiva **analisi istologica**.
 - ❖ **Brushing bronchiale:** spazzolato bronchiale che permette la raccolta di cellule dalla parete bronchiale. Le cellule vengono fissate su vetrino per l'**analisi citologica**.
 - ❖ **Lavaggio broncoalveolare:** attraverso il **broncoscopio** si immette NaCl 0.9% a 37°C nei distretti bronchiali in studio con suo successivo recupero attraverso aspirazione. Il materiale così raccolto, la cui composizione cellulare riflette quella dell'ambiente polmonare profondo, viene sottoposto ad analisi citologica.
 - ❖ **Agoaspirazione di neoformazioni polmonari** : se la lesione è raggiungibile con lo strumento, è possibile eseguirne l'agoaspirazione con ago sottile. Il materiale raccolto viene strisciato su vetrino, fissato e eventualmente colorato per l'analisi citologica.
 - ❖ **Agoaspirazione trans-bronchiale di linfonodi patologici alle scansioni TC (con diametro superiore a 15 mm):** i linfonodi studiati sono quelli situati a ridosso della parete dei grossi bronchi e della trachea. Il materiale prelevato viene fissato su vetrino, eventualmente colorato e sottoposto ad analisi citologica.
 - ❖ **Broncoaspirato:** rappresenta il materiale ottenuto dalla aspirazione delle secrezioni bronchiali durante l'intero esame endoscopico. Il materiale raccolto viene poi processato per l'analisi citologica.

In tutti i casi di broncoscopia negativa con mancata tipizzazione della lesione si potrà ricorrere all'uso di **metodiche più invasive**, gli agoaspirati Rx-TAC guidati, soprattutto per le forme periferiche, o nel caso di neoplasie che giungano a contatto con la parete toracica ad agoaspirati eco-guidati.

- **Agobiopsia transparietale TC guidata e Agoaspirato transparietale con ago sottile:** in presenza di una neoformazione polmonare periferica (diametro <3 cm), non raggiungibile per via broncoscopica, per l'accertamento cito-istologico si può procedere, con prelievo di materiale diagnostico per via trans-toracica.
- **Mediastinoscopia:** indagine endoscopica attraverso una via neoformata, anteriormente alla trachea. È un esame di staging preoperatorio in pazienti che all'indagine TC presentavano un aumento di diametro dei linfonodi mediastinici (stadio IIIA-B) che possono così essere raggiunti, visionati e biopsiati.
- **Mediastinotomia:** incisione dell'estremità anteriore della II^a costa di sinistra. Si possono eseguire biopsie dei linfonodi pre-aortici e sotto aortici non raggiungibili con mediastinoscopio.
- **Toracoscopia:** quando è indispensabile ottenere biopsie su linfonodi non raggiungibili con mediastinoscopio, come linfonodi paraesofagei o sub carenali posteriori. Il toracoscopio viene inserito nel torace attraverso una piccola incisione della parete toracica. Nelle lesioni con versamento pleurico, la **video-toracoscopia**, tecnica più recente, permette non solo di confermare l'eventuale interessamento pleurico neoplastico ma anche di ottenere una tipizzazione della lesione.
- **TC o TAC (tomografia assiale computerizzata):** valuta con sufficiente accuratezza non solo il parametro T ma anche l'N e riveste importanza primaria per la stadiazione extratoracica della malattia, soprattutto a livello dell'addome superiore (fegato, reni, surreni, linfonodi retroperitoneali) e dell'encefalo.

➤ **Scintigrafia scheletrica e risonanza magnetica nucleare:** utilizzate per definire il parametro M. Sicuramente tra tutte questi tipi di indagini, più o meno invasive, l'esame broncoscopico può essere considerato come esame di prima linea. Consente di effettuare una diagnosi precisa e allo stesso tempo fornisce preziose informazioni sulla presenza di cellule tumorali anche ai linfonodi ilo-mediastinici, dato di fondamentale importanza per la valutazione dell'estensione di malattia (stadiazione della neoplasia). Le lesioni periferiche sub-pleuriche di diametro fino a 2 cm possono essere asportate mediante **video-chirurgia** che ne permette la diagnosi. Una volta accertata la diagnosi cito-istologica occorre stabilire la reale estensione clinica intra ed extra-toracica della neoplasia: **l'iter diagnostico e stadiativo sono strettamente connessi tra loro**. La **tomografia ad emissione di positroni (PET)** è utile nella diagnosi differenziale tra cancro polmonare recidivo o persistente e la fibrosi postattinica in pazienti precedentemente sottoposti alla radioterapia.

LA STADIAZIONE (SISTEMA TNM)

Ottenuta la diagnosi cito-istologica di neoplasia polmonare, è necessario valutare l'esatta estensione della malattia e cioè definirne una classificazione clinica in Stadi (*Mountain, 1997; Massion et Carbone, 2003*). La stadiazione (*staging*), raggruppando i pazienti in gruppi omogenei, è utile per una programmazione terapeutica più appropriata, una formulazione prognostica più precisa e un confronto dei risultati delle diverse casistiche. Effettuata in corso di terapia documenta la risposta od evidenzia eventuali recidive della malattia (**re-staging**).

Il Sistema TNM: applicabile a tutte le sedi anatomiche, descrive l'estensione anatomica del tumore, basandosi sulla valutazione di 3 componenti:

T - identifica l'estensione del tumore primitivo.

N - identifica l'estensione di metastasi nei linfonodi regionali.

M - identifica l'assenza o la presenza di metastasi a distanza.

L'aggiunta di numeri arabi a queste tre componenti indica l'estensione del tumore, cioè:

- T0, T1, T2, T3, T4

- N0, N1, N2, N3

- M0, M1

Alle categorie T,N,M sono associati diversi **stadi**, indicati con i numeri romani: **0** (carcinoma *in situ*), **I, II, III, IV (metastasi a distanza)**. La stratificazione adottata è tale da assicurare, per quanto possibile, che ogni stadio sia abbastanza omogeneo nei confronti della sopravvivenza.

Per ogni sede sono descritte due classificazioni, cioè:

1. Classificazione clinica (classificazione clinica pre-trattamento), indicata come **TNM** (o cTNM), basata sui dati raccolti prima del trattamento, attraverso l'esame obiettivo, le tecniche d'immagine, l'endoscopia bronchiale, le biopsie ed altri esami specifici ed è utile per discutere le indicazioni al trattamento primario.

2. Classificazione patologica (classificazione istopatologica o post-chirurgica) indicata come **pTNM**, basata sui dati derivati dall'intervento chirurgico e dagli esami isto-patologici sul pezzo operatorio. La classificazione patologica non sostituisce quella clinica. E' utile per avere informazioni sulla prognosi e può essere anche utilizzata in alcuni casi per decidere l'impiego di una terapia adiuvante.

A queste informazioni si possono aggiungere quelle derivate dall'analisi microscopica circa il grado di differenziazione cellulare, il **Grading istopatologico**, di importante valore prognostico. Esso si basa sull'analisi di 3 parametri: **differenziazione citologica** delle cellule tumorali, **n° di mitosi e presenza di atipie nucleari**.

GX	Il grado di differenziazione non può essere definito.
-----------	---

G1	Ben differenziato.
G2	Moderatamente differenziato.
G3	Poco differenziato.
G4	Indifferenziato.

Tabella 1. Il Grading tumorale. **Grading 1 e 2 : neoplasie a “basso grado” di malignità; Gradi 3 e 4: ad “alto grado” di malignità.** Il grado non è applicabile al mesotelioma pleurico ed ad altri tipi tumorali.

Il Sistema TNM e la neoplasia polmonare è necessaria prima di tutto la verifica istologica del tumore ed i casi vanno considerati separatamente in base al tipo istologico. La forma istologica neuroendocrina a piccole cellule (SCLC) presenta infatti una stadiazione differente dalle forme di origine epiteliale (NSCLC). La classificazione TNM, aggiornata sino alla sua 5° edizione, prevede sia la classificazione clinica che la patologica (*Sobin et al., 1997*) (le categorie pT, pN e pM corrispondono alle categorie T, N e M). Di seguito è riportata la **stadiazione per NSCLC:**

T- Tumore primitivo

TX	Il tumore primitivo non può essere definito, oppure ne è provata l'esistenza per la presenza di cellule atipiche nell'escreato o nel liquido di lavaggio bronchiale, ma non è visualizzato con le tecniche per immagini o con la broncoscopia
T0	Non segni del tumore primitivo
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumore di 3 cm o meno nella sua dimensione massima, circondato da polmone e da pleura viscerale, e alla broncoscopia non si rilevano segni d'invasione più prossimale del bronco ilare (per es. non nel bronco principale)*
T2	Tumore con una qualsiasi delle seguenti caratteristiche di dimensione o estensione: - superiore a 3 cm nella dimensione massima - interessamento del bronco principale, 2 cm o più distalmente dalla carina - invasione della pleura viscerale - associato ad atelectasia o polmonite ostruttiva che si estende alla regione ilare, ma non interessa il polmone in toto
T3	Tumore di qualunque dimensione che invade direttamente una delle seguenti strutture: parete toracica (inclusi i tumori del sulcus superiore), diaframma, pleura mediastinica, pericardio parietale; oppure tumore del bronco principale a meno di 2 cm distalmente alla carina, ma senza interessamento della carina stessa; oppure associato ad atelectasia o polmonite ostruttiva in toto
T4	Tumore di qualunque dimensione che invade direttamente una delle seguenti strutture: mediastino, cuore, grossi vasi, trachea, esofago, corpi vertebrali, carina; oppure nodulo(i) neoplastico(i) separato(i) nello stesso lobo** oppure tumore con versamento pleurico maligno***

Tabella 2. Categoria T delle neoplasie polmonari **NSCLC**.

*T1= tumore a diffusione superficiale, poco frequente, di qualunque dimensione, con componente invasiva limitata alla parete bronchiale, che può estendersi prossimalmente al bronco principale.

** I noduli nel polmone ipsilaterale al tumore primario, non contenuti nello stesso lobo sono classificati come M1.

***La maggior parte dei versamenti pleurici associati al carcinoma polmonare è dovuta alla neoplasia. Tuttavia in alcuni pazienti si hanno esami citopatologici del liquido pleurico (non ematico e non essudativo) ripetutamente negativi. Quando questi dati ed il giudizio clinico indicano che il versamento non è neoplastico, esso dovrebbe essere escluso come elemento per la stadiazione ed il paziente deve essere classificato come T1, T2 o T3. La categoria T2 include sia il tumore che infila la membrana elastica della pleura viscerale che il tumore presente sulla superficie della pleura viscerale.

N-linfonodi: l'esame istologico di un pezzo operatorio ottenuto con una linfadenectomia ilare o mediastinica include di norma 6 o più linfonodi (*linfonodi regionali, intratoracici, mediastinici, peribronchiali ed ilari*).

NX	I linfonodi regionali non possono essere definiti
N0	Assenza di metastasi nei linfonodi regionali
N1	Metastasi nei linfonodi omolaterali peribronchiali e/o omolaterali ilari e Intrapolmonari, comprendendo anche l'interessamento per estensione diretta
N2	Metastasi in linfonodi mediastinici omolaterali e/o sottocarinali
N3	Metastasi nei linfonodi mediastinici controlaterali, negli ilari controlaterali, negli scalenici o nei sovraclaveari omo- o controlaterali

Tabella 3. Categoria N delle neoplasie polmonari **NSCLC**.

M- metastasi: gli organi bersaglio del tumore polmonare come sedi di interessamento metastatico sono il fegato, le surreni, il cervello (10% dei pazienti presenta metastasi cerebrali alla diagnosi mentre nel 25-35% dei casi esse si sviluppano nel corso della malattia), le ossa (nel 20-50% dei pazienti, soprattutto alle vertebre, con fratture ossee nel 10% dei casi), la cute, le localizzazioni al di fuori del lobo interessato dalla neoplasia primitiva ed i linfonodi addominali, ascellari ed inguinali. Si procede ai fini della stadiazione alla valutazione della TC addome completo ed encefalo ed **esame scintigrafico "total body"** che segnala eventuali secondarismi ossei. Questa indagine utilizza come mezzo rilevatore dei composti fosfatici marcati con ^{99m}Tc (tecnezio) che vengono captati dal tessuto osseo (le aree di ipercaptazione corrispondono ad un aumento dell'attività osteoblastica che accompagna i fenomeni di osteolisi metastatica). Tale metodica è più sensibile della radiografia standard e può anticipare di 4-6 mesi l'individuazione delle metastasi, ma ha bassa specificità. Se necessario è possibile ricorrere alla **PET** (Giorgetti et al., 2002). Queste metodiche permettono l'acquisizione di immagini a carattere biochimico-metabolico. La rilevazione della captazione dell'¹⁸F-deossiglucosio (FDG), somministrato endovena, associata al metabolismo glucidico è un efficace mezzo di dimostrazione della presenza di tessuto vitale mediante PET. La cellula neoplastica metabolizza più rapidamente rispetto alle cellule normali l'FDG, fosforilandolo a FDG-P e l'accumulo intracellulare del tracciante corrisponde di solito a metastasi spesso

occulte. Recentemente nei pazienti con NSCLC resecabile (stadi I e II) la scintigrafia ossea è eseguita solo in presenza di dolore osseo e/o alterazioni di alcuni esami ematici (calcemia e fosfatasi alcalina) mentre per i SCLC viene sempre eseguita essendo questo istotipo già metastatico alla diagnosi in oltre 2/3 dei casi. Anche la TC dell'encefalo dovrebbe essere eseguita solo in presenza di sintomi neurologici o in caso di sospetto SCLC. La **risonanza magnetica nucleare (RMN)** viene utilizzata per la ricerca di metastasi midollari della colonna vertebrale e di lesioni molto piccole encefaliche.

MX	La presenza di metastasi a distanza non può essere definita
M0	Assenza di metastasi a distanza
M1	Presenza di metastasi a distanza sono compresi noduli neoplastici (unici o multipli) separati in un altro lobo (omo- o controlaterale)

Tabella 3. Categoria M delle neoplasie polmonari **NSCLC**.

La definizione dei vari parametri (T, N, M e/o pT,pN,pM) consente di attribuire ad ogni paziente uno stadio clinico (essenziale per scegliere e valutare la terapia) ed uno patologico (dà indicazioni utili per la prognosi e per valutare i risultati finali) di malattia (**Tabella 4a**).

Carcinoma occulto	TX	N0	M0
Stadio 0	Tis	N0	M0
Stadio IA	T1	N0	M0
Stadio IB	T2	N0	M0
Stadio IIA	T1	N1	M0
Stadio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadio IIIA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Stadio IIIB	Ogni T	N3	M0
	T4	ogni N	M0
Stadio IV	Ogni T	ogni N	M1

Tabella 4a. Stadiazione TNM del carcinoma polmonare **NSCLC**.

La revisione della classificazione TNM da parte dell' Unione Internazionale contro il Cancro (UICC) nel 1997 (*Mountain, 1997*) correla meglio con la prognosi per pazienti di NSCLC (**Tabella 4b**) (*Pasini et al., 2003*).

Stadio TNM	Sopravvivenza %		
	A 1 anno	a 3 anni	a 5 anni
IA	94	80	67
IB	87	67	57
IIA	89	66	55

IIB	73	46	39
IIIA	64	32	23
IIIB	34	7	5
Stadio IV	19	2	1

Tabella 4b. Sopravvivenza a 1, 3, 5 anni suddivisa per stadio di neoplasia **NSCLC**.

Per quanto riguarda la **stadiazione SCLC** (Micke et al., 2002), la dizione comune prevede la **differenziazione in:**

- ❖ **malattia limitata:** tumore localizzato ad un emitorace anche con coinvolgimento dei linfonodi ilari omolaterali o omo e controlaterali mediastinici e sovraclaveari con o senza versamento pleurico omolaterale. Corrisponde agli stadi IA-IIIB della classificazione TNM.
- ❖ **malattia estesa:** 63% all'esordio, tumore con metastasi polmonari controlaterali o a distanza (ossa, fegato, cervello, surreni) o diffusione pleurica. Corrisponde allo stadio IIIB con versamento pleurico e IV del TNM.

FATTORI PROGNOSTICI

Sono caratteristiche legate alla neoplasia ed al paziente, in grado di condizionare l'evoluzione della malattia o di influenzare l'esito di un trattamento. I fattori determinanti la prognosi dopo l'intervento chirurgico di tumore polmonare comprendono lo stadio di malattia (dimensioni del tumore e la presenza o meno di metastasi linfonodali), la classificazione patologica, il tipo istologico (l'epidermoide, un tipo di NSCLC ben differenziato è il più favorevole), stato di validità clinica della persona (*performance status*), la presenza o meno di calo ponderale negli ultimi 4-6 mesi, l'età, le terapie adiuvanti e neoadiuvanti (quest'ultima allo stadio N2 sembra migliorare la curabilità chirurgica e la sopravvivenza), l'espressione di geni correlati al cancro (Ki 67, K-ras, bcl-2, FHIT e telomerasi,...) così come i valori ematici di alcuni markers tumorali e di malattia [es. antigene carcinoembrionale (CEA) e il polipeptidico tissutale TPA; cromogranina A, ProGPR, NSE, CYFRA 21-1 in SCLC; SPR1,..], la presenza di malattie concomitanti o pregresse (es. la malattia ostruttiva cronica COPD e la polmonare interstiziale), l'abitudine al fumo e l'atteggiamento psichico (Osaki et al., 2001 et 2004; Junker, 2001; Wallace et al., 2003; Wu et al., 1999; Taga et al., 1999; Komiya et al., 2000; Wang et al., 2000 et 2002; Pasini et al., 2002; Sekine et Fujisawa, 2003; Buccheri et Ferrigno, 1995 et 2004; Svobodnik et al., 2004; Yokota et Kohno, 2004; Taneja et Sharma, 2004; Destro et al., 2004; Meert et al., 2004; Tomida et al., 2004). Lo stato patologico (specialmente lo stato N) è il fattore più influente per la ricorrenza del tumore, la metastatizzazione ed il tempo di sopravvivenza. La TC di torace, addome e cranio ha dimostrato un potere predittivo dell'operabilità nel 77% dei casi, lievemente maggiore di quello del test TPA (65%) e CEA (69%) e quest'ultimo si è rivelato più predittivo di ogni altro metodo nel pronosticare la possibile recidiva post-

chirurgica (correttezza diagnostica complessiva: 83%). Per i pazienti in stadio III e IV sono sicuramente fattori prognostici il performance status, la presenza o meno di calo ponderale, la presenza di metastasi e la loro localizzazione. In uno studio condotto su campioni di NSCLC ottenuti da pazienti operati e senza altro tipo di trattamento, è stato evidenziato un **effetto cooperativo tra attività telomerasica e l'espressione di p16** nella valutazione prognostica, specialmente agli stadi I e II (*Gonzales-Quevedo et al., 2002*). È stata evidenziata inoltre un'associazione tra neoplasia polmonare e presenza di ripezioni minisatellite disposte in tandem e polimorfiche (denominate MNS 16A) nella regione downstream del gene per la **telomerasi** (*Wang et al., 2003*).

LA TERAPIA

La pianificazione di un trattamento è possibile solo dopo un'adeguata stadiazione del paziente. L'approccio al paziente deve essere multidisciplinare e gli interventi terapeutici possibili sono suddivisi in tre diverse modalità: **Terapia Chirurgica, Terapia Medica e Radioterapia** (*Nosenzo et Tassi, 2000; Di Mari A.*).

Carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC):

- **Trattamento chirurgico:** in quanto asportazione completa della neoplasia, è considerata l'unica vera possibilità di guarigione. I pazienti considerati operabili sono allo *stadio I - II - IIIA*, gli esclusi, con rare eccezioni (chirurgia "palliativa" o di salvataggio in caso di ascessualizzazione della neoplasia o sanguinamento incontrollabile nelle vie aeree), allo **stadio IIIB e IV**. Per i casi allo **stadio I e II** il trattamento chirurgico non è preceduto o seguito da polichemioterapia né radioterapia. Il paziente viene seguito con uno stretto follow-up e la sopravvivenza a 5 anni è stimata essere tra il 60-85 % per lo stadio I e tra il 40-60 % per il II stadio. Per i pazienti allo **stadio IIIA**, il primo approccio è dato dall'intervento chirurgico con resezione in blocco del polmone e delle strutture invase dalla neoplasia. La sopravvivenza a 5 anni a questo stadio si attesta intorno al 30 – 40 %. Una metanalisi basata su 52 studi randomizzati ha dimostrato come l'associazione chirurgia+CT rispetto alla sola chirurgia conferisca un vantaggio assoluto di sopravvivenza a 5 anni del 5% (*NSCLC Collaborative Group, 1995*). La chirurgia conserva il suo ruolo elettivo anche in presenza di recidive polmonari locali o di un secondo tumore polmonare, quando la lesione è radicalmente asportabile.
- **Trattamento chemioterapico:** attualmente il suo ruolo è triplice e gli obiettivi con cui viene utilizzato sono diversi (*Gridelli et al., 2003*). Si può parlare di:
 - ❖ **Chemioterapia neoadiuvante:** il trattamento viene utilizzato prima dell'intervento chirurgico allo scopo di rendere asportabile completamente la lesione primitiva (stadio IIIA N₂ e IIIB) con la riduzione del volume tumorale ed inducendo un "down-staging" (sottostadiazione) della neoplasia (40-50% dei casi), ridurre il rischio di recidive locali e garantire una protezione verso eventuali

micrometastasi minimizzando inoltre la possibilità di diffusione di cellule tumorali vitali in seguito all'intervento chirurgico. Con questo trattamento il 20% circa degli operati rimane libero dalla malattia a 5 anni. Vengono utilizzati schemi di polichemioterapia da 2 a 4 cicli con derivati del platino, gemcitabina, vinorelbina. Questo tipo di terapia è molto promettente per il futuro prossimo e sono attualmente in corso studi atti a valutarne l'efficacia anche negli stadi precoci resecabili (Stadio I e II).

- ❖ **Chemioterapia adiuvante:** prevede la somministrazione di una terapia sistemica dopo intervento chirurgico o radioterapico radicale a scopo di consolidamento, data l'alta incidenza di ripresa di malattia dopo chirurgia radicale. Prevede schemi di polichemioterapia comprendenti cisplatino. Nel post-operatorio dei pazienti allo stadio IIIA è sempre eseguita la polichemioterapia adiuvante. Il fallimento di una terapia post-operatoria basata su schemi storici è stato decretato (*Keller et al., 2000*) e recentemente confermato dal trial ALPI (Adjuvant Lung Project Italy) (AIOM del 2002) ma associando tale CT alla RT negli stadi IIIA e IIIB i risultati migliorano: 71% resezioni radicali, 39% down-staging e 20% di sopravvivenza a 6 anni (*Albain et al., 1999*). L'utilizzo di altre combinazioni di farmaci ha dato percentuali di risposta diverse: 77.5% con Gem e Cis; 59% con paclitaxel e carboplatino (EORTC: *Van Zandwijk et al., 1998; O'Brien Metal, 1999*). Attualmente sono in corso ampi studi randomizzati in Canada (NCI-C), in Inghilterra (BLT), in Francia (ANITA 01 e ANITA 02) e lo studio IALT (International Adjuvant Lung Cancer Trial). Concludendo quindi ad oggi la terapia adiuvante risulta proponibile solo nell'ambito di ampi trial clinici controllati e nel caso di malattia residua macro-microscopica (radioterapia+/-chemioterapia).
- ❖ **Chemioterapia per la malattia avanzata o palliativa:** in caso di *non resecabilità* della neoplasia, *non operabilità* del paziente, *neoplasie allo stadio IIIB e IV*. Il suo ruolo è rivolto alla riduzione della massa tumorale, all'effetto palliativo dei sintomi ed al miglioramento della qualità di vita. Va eseguita in pazienti in buone condizioni generali, senza fattori di co-morbilità (malattia cardiovascolare, patologia epatica o renale) e con il loro consenso. Per lo stadio IIIB il trattamento standard prevede CT e RT sequenziali o concomitanti (*Nguyen et al., 1999*) con aumento della sopravvivenza media di 18-20 mesi e significativa riduzione di metastatizzazione rispetto all'utilizzo della sola RT. Il trattamento chemioterapico è gravato da fenomeni di **tossicità** che si manifestano soprattutto come: mielotossicità, tossicità gastro-enterica, neurologica periferica, renale, alopecia. Il trattamento prevede:
 - fino a 70 anni d'età: polichemioterapia con cisplatino (associazioni con cisplatino, gemcitabina, vinorelbina, etoposide, taxani, irinotecan, topotecan)
 - oltre i 70 anni d'età: monochemioterapia a base di gemcitabina o vinorelbina. Si esclude il cisplatino per la grande tossicità, soprattutto renale.

Le **associazioni polichemioterapiche** (Cis+Gem; Cis+Vinorelbina; Carboplatino+Paclitaxel) sono il gold standard dal '90, avendo dimostrato in studi randomizzati la loro superiorità rispetto ai regimi classici dell'inizio degli anni '80 (Mitomicina C+Ifosfamide+Cis; Mitomicina C+Vindesina+Cis; Cis+Vindesina; Cis+Etoposide) che davano risposta obiettiva solo nel 15-20% dei casi se impiegati singolarmente, 30-40% se in combinazione (*Crinò et al., 1999; Le Chevalier et al., 1994; Cardenal et al., 1999*). I dati di diversi trials clinici hanno confermato la superiorità di efficacia terapeutica della combinazione di 2 farmaci (polichemioterapia) rispetto alla monoterapia nel trattamento di NSCLC in stadio avanzato. Si è giunti così ad un tempo mediano di sopravvivenza di circa 11 mesi, sopravvivenza ad 1 anno del 35-40% e risposte obiettive oscillanti tra il 30% ed il 60%. La **combinazione Gem/Cis** ha dimostrato in trials clinici randomizzati una efficacia confrontabile con quella di Vinorelbina/Cis, paclitaxel/Cis, paclitaxel/carboplatino o docetaxel/Cis risultando il tipo di trattamento migliore, in un ottica di costo-beneficio, come prima linea di trattamento in Europa (*Scagliotti et al., 2002; Schiller et al., 2004*). Le uniche differenze erano nel profilo di tossicità: CDDP+VNR dava mielotossicità più spiccata, CDDP+Gem trombocitopenia e carboplatino+paclitaxel alopecia e neuropatie. **Il trattamento di prima linea consigliabile per NSCLC in stadio avanzato comprende quindi derivati del platino e gemcitabina per 5 cicli.** In pazienti con prognosi meno favorevole è indicata una monochemioterapia oppure una combinazione a basso profilo di tossicità, escludendo quindi il cisplatino, oppure un solo trattamento sintomatico. Il trattamento di seconda linea da attuarsi in seguito alla progressione della malattia, prevede di regola l'utilizzo di tassani (Docetaxel) (*Shepherd et al., 2000; Fossella et al., 2000*), vinorelbina e gemcitabina, tutti farmaci di terza generazione. **Nuovi antimetaboliti somministrati da soli o in combinazione hanno recentemente cambiato l'approccio terapeutico.** Uno di essi, il **pemetrexed (Alimta)**, inibitore della timidilato sintetasi a base di folato, in trials clinici per il trattamento di seconda linea di pazienti con NSCLC si è dimostrato efficace, ben tollerato ed utilizzabile sia come monoterapia sia in combinazione con altri agenti ad alte dosi, mentre in pazienti di mesotelioma, somministrato in associazione con il cisplatino, ha incrementato la risposta, la sopravvivenza e migliorato la qualità della vita. I suoi effetti tossici risultano minimizzati con la supplementazione di folati e vitamina B12 (*Bunn, 2004*). **Il pemetrexed è attualmente utilizzato nella terapia del mesotelioma presso l'Ospedale "Maggiore della Carità" di Novara e tale struttura ospedaliera sarà coinvolta, dal Gennaio 2005, nell'attuazione di un trial clinico che prevederà l'utilizzo di questo farmaco come seconda linea di trattamento del NSCLC.** In uno studio di fase III in cui si comparava l'utilizzo di pemetrexed vs docetaxel come seconda linea di trattamento il tempo di sopravvivenza risultava paragonabile ma gli effetti collaterali erano significativamente meno frequenti e severi nei

pazienti trattati con solo pemetrexed (*Zinner et al., 2004*). I risultati di un recente trial Taxotere vs pemetrexed dimostrano un'efficacia simile ma minore tossicità per il pemetrexed. Un altro composto, il **gefitinib (Iressa™, ZD 1839)** è stato recentemente approvato dall' U.S. Food and Drug Administration **per il trattamento di NSCLC in stadio avanzato come terapia di mantenimento durante il periodo successivo alla chemioterapia a base di composti del platino e docetaxel (trattamento di prima linea) fino all'inizio del trattamento di seconda linea** (*Kris et al., 2000*). Tale terapia è attualmente utilizzata presso l'Ospedale "Maggiore della Carità" di Novara, secondo un protocollo EORTC. I pazienti che meglio rispondono a questo tipo di trattamento sono i non fumatori e quelli con istotipo tumorale broncoalveolare (*Evans et al., 2004*). Un alto grado di risposta sembra associata alla presenza di mutazioni del recettore EGFR, bersaglio farmacologico di Iressa™. La risposta al trattamento con gefitinib risulta inoltre correlata alla razza, con percentuali del 28% nei pazienti giapponesi e del 10% nei caucasici, ed al sesso, essendo più frequente nelle ♀.

- **Fotochemioterapia (terapia fotodinamica o endoscopica fotodinamica, fototerapia) PDT:** in fase di sperimentazione clinica per il trattamento di alcuni sottotipi di NSCLC allo stadio 0 (carcinoma *in situ*, malattia mini-invasiva) quando la CT e l'RT non sono indicate. Consiste nell'iniezione endovenosa di un farmaco fotosensibilizzante che viene assorbito da tutte le cellule ma rimane più a lungo in quelle tumorali le quali vengono uccise dall'ossigeno attivo prodotto dal farmaco in seguito ad attivazione con luce laser. Viene anche impiegata come trattamento palliativo per tumore allo stadio IV nei casi di ostruzioni bronchiali, riducendo la dimensione del tumore e liberando le vie aeree.
- **Trattamento radioterapico:** erogazione di radiazioni ionizzanti elettromagnetiche e corpuscolari per produrre effetti chimici e biologici ed in particolare l'uccisione delle cellule tumorali entro il volume irradiato.
- ❖ **Curativo:**
 - radioterapia pre-operatoria (neo-adiuvante): per ridurre le dimensioni della massa neoplastica, aumentare la resecabilità chirurgica (efficacia pari al 50%) e ridurre la diffusione metastatica. Non ha impatto significativo sulla sopravvivenza. Nei T₃ (IIIA e IIIB) l'associazione di RT preoperatoria (30-50 Gray) con la chemioterapia ha dimostrato di migliorare la prognosi a distanza, probabilmente per l'effetto su micro-metastasi già presenti alla stadiazione pre-chirurgica ma non evidenti per il limite di risoluzione delle metodiche di indagine disponibili, e maggior efficacia nel controllo della malattia stessa (riduzione di stadio al pTNM).

- post-operatoria (adiuvante): per ridurre le recidive locoregionale (31% di recidive dopo sola chirurgia vs 3% dopo RT). Viene utilizzata nei casi N+, alle dosi di 45-50 Gy ma l'efficacia è dubbia e non ha impatto sulla sopravvivenza.
- radioterapia radicale: utilizzata negli stadi I e II e quando esistono controindicazioni mediche alla chirurgia. La sopravvivenza a 2 anni risulta del 17% ed a 5 anni del 25-30%. Le dosi sono 180-200 cGy per frazione fino alla dose totale di 60-65 Gy che può dare tossicità al midollo, al cuore con fibrosi del miocardio, al polmone con polmonite attinica che può evolvere in fibrosi polmonare. Per gli **stadi IIIA e IIIB** viene **associata alla chemioterapia** (Cis, Carboplatino, Bleomicina, Endoxan, Vinorelbina, Etoposide, CPT11, Topotecan, Taxani, Gemcitabina che è radiosensibilizzante) per aumentare la risposta locale e ridurre le metastasi a distanza con un incremento assoluto della sopravvivenza a 5 anni del 2% e tempo di sopravvivenza mediana di 19,2 mesi vs 14,6 mesi ottenuti con la sola RT. Con tale associazione RT+CT circa il 40-50% dei pazienti curati sopravvive ad 1 anno.
- ❖ **Palliativo**: per lo stadio IV di malattia (nel 52% dei casi risoluzione dei sintomi, sopravvivenza media 5-6 mesi), per il trattamento di sindrome mediastinica, progressione del tumore primitivo dopo chemioterapia, metastasi ossee, metastasi encefaliche. Dosi: 30 Gy/10 frazionamenti; 20 Gy/5 frazionamenti.

Nonostante i grandi progressi nell'oncologia medica grazie all'avvento dei nuovi farmaci ed all'affinamento delle tecniche chirurgiche e radioterapiche, l'aumento di sopravvivenza globale negli ultimi 15 anni è passato dall'8% al 15% (vd. **Tabella 4b**), considerando inoltre che il 70% di NSCLC si riscontra in fase localmente avanzata (40%) o metastatica (30%).

Carcinoma a piccole cellule (SCLC) o microcitoma : si caratterizza e diversifica dalle altre neoplasie polmonari per il comportamento biologico particolarmente maligno e per il diverso approccio terapeutico che richiede.

- **Trattamento chirurgico**: utilizzato nelle forme localizzate a volte anche come momento diagnostico, non modificando l'andamento prognostico della malattia stessa.
- **Trattamento chemioterapico**: lo SCLC è principalmente una neoplasia chemiosensibile ed il fenomeno della chemioresistenza, molto frequente, sembra collegato ad un effetto protettivo della matrice extracellulare (mediato dalle integrine) (*Buttery et al., 2004*). La terapia di elezione risulta quindi essere il trattamento CT/RT. In questo campo, la polichemioterapia ha sicuramente migliorato i tassi di remissione completa da malattia (30-50% per le forme intratoraciche e 15-30% per le forme estese) e la sopravvivenza. La chemioterapia viene dunque eseguita **a tutti gli stadi** anche se la durata della risposta è breve, di circa 6-8 mesi (*Pasini et al., 2002*). È raro osservare ulteriori

miglioramenti dopo 12 settimane di terapia. È **importante l'efficacia della terapia di prima linea perché in questo tipo di tumore le terapie di seconda linea non dimostrano la stessa efficacia.**

La sopravvivenza mediana si stima essere di 14-20 mesi per la malattia limitata e 8-13 mesi per quella estesa. Nella malattia limitata la sopravvivenza a 2 anni dipende dall'estensione intratoracica e dalla possibilità di effettuare trattamenti combinati di CT e RT ed è ~ del 10-40% ed a 5 anni del 6-12%. Il **ruolo della chemioterapia nella malattia estesa** risulta **palliativo**, con un tasso di risposte totali del 65-85%, una mediana di sopravvivenza inferiore ai 12 mesi, una sopravvivenza a 2 anni dello 0-5%. In specifico, in base allo stadio di malattia, la terapia prevede:

- ❖ **Stadio I-II:** sono meno del 10 % dei casi. La chemioterapia adiuvante permette una sopravvivenza a 5 anni del 35-40%, se invece è eseguita come neoadiuvante, la sopravvivenza a 5 anni si sposta tra il 35% e il 60%. La cura chemioterapica standard si basa su: cisplatino o carboplatino con etoposide eseguito per 4 cicli
- ❖ **Stadio IIIA-IIIB e IV:** è valida la stessa associazione di farmaci che si applica agli stadi I e II. Per lo stadio IV la CT palliativa si esegue per 6-8 cicli. Il regime per la malattia estesa precedente all'introduzione dello schema di **prima linea Cis+Etoposide**, ossia **Ciclofosfamide, Adriamicina e Vincristina (CAV)** è ora utilizzato come **seconda linea di trattamento** in questo tipo di patologia, essendo risultato meno tollerato ed efficace (51% di risposte vs 61%) (*Roth et al., 1992*). **Non è dimostrata** comunque **l'utilità di una terapia di mantenimento**. Nel caso in cui il paziente abbia più di 70 anni è necessario sostituire nel piano di trattamento di prima linea il cisplatino con carboplatino per ridurre il grado di tossicità del trattamento. Altri farmaci si sono dimostrati attivi sul microcitoma tra cui la Vinorelbina (*Gridelli et al., 1998*), il Docetaxel ed il Topotecan. La maggiore tossicità riscontrata con tali regimi polichemioterapici è ematologica (leucopiastrinopenia ed anemia) e gastroenterica (nausea e vomito); quella neurologica periferica è correlata all'utilizzo degli alcaloidi della vinca ed al cisplatino. L'effetto della chemioterapia sulla malattia in recidiva, contrariamente ai trattamenti di prima linea, è meno evidente: le probabilità di ulteriore risposta sono direttamente correlate con la lunghezza del periodo libero da progressione.
- **Trattamento radioterapico:** può essere impiegato, con le stesse considerazioni espresse per il NSCLC, come **radioterapia palliativa** dei sintomi o delle metastasi e con finalità profilattica sull'encefalo (all'esordio il 10% dei pazienti presenta metastasi cerebrali e con questo trattamento si riduce la frequenza di tale metastatizzazione dal 24% al 6% ma non ha impatto sulla sopravvivenza) e di consolidamento dopo chemioterapia primaria (dose suggerita 45-50 Gy). L'elevata incidenza di ripresa locoregionale (oltre 80% di recidive toraciche dopo la sola CT) nella **malattia limitata** giustifica l'impiego della **RT curativa associata a polichemioterapia (CT)**. Questo approccio

terapeutico ha ridotto la probabilità di ripresa di malattia al 36%, con sopravvivenza a 2 anni del 15-35%. In questi ultimi anni la RT viene utilizzata tra il primo ed il secondo ciclo chemioterapico.

In conclusione i farmaci chemioterapici utilizzati per i tumori polmonari si dividono in:

- ❖ **Alchilanti:** ciclofosfamide (Endoxan®) per Ca polmonare; isofosfamide (HoloXan®; Ifex®) per Ca. bronchiale.
- ❖ **Antibiotici:** doxorubicina HC1 (Adriamicina®, Adriblastina®) ed epirubicina (Farmorubicina®) per Ca. polmonare; Mitomicina C (Mitimycin C®) per adenocarcinoma polmonare.
- ❖ **Antimetaboliti:** gemcitabina (Gemzar®) e pemetrexed (Alimta®) per NSCLC localmente avanzato o metastatico; metotrexato (Metotrexate®) e tegafur (Citofur®) per Ca. polmonare.
- ❖ **Alcaloidi:** docetaxel (Taxotere®) per Ca. polmonare; etoposide o VP16 (Vepesid®) per SCLC; paclitaxel (Taxolo®) per NSCLC avanzato; teniposide (Vumom®) per microcitoma polmonare; vinorelbina (Navelbine®, la cui nuova formulazione prevede la somministrazione orale) per NSCLC; vincristina (Oncovin®) per SCLC.
- ❖ **Platino derivati:** cisplatino (Platinex®, Platamine®) per SCLC; carboplatino (Paraplatin®) per Ca. polmonare; nedaplatino (derivato di seconda generazione del platino con minore tossicità midollare, in trials clinici).
- ❖ **Altri:** Irinotecan o CPT-11 (Campto®) per Ca. polmonare (in trials clinici in Italia); topotecan (Hycamtin®) per Ca. pomonare.

Le principali linee di tendenza emerse dal dibattito scientifico nel 10° WCLC di (Vancouver, 2003), sono:

- Una maggiore estensione all'indicazione alla CT, oggi sempre più spesso praticata nei pazienti "elderly" (anziani) o "unfit" (con condizioni cliniche scadute) od in situazioni cliniche particolari come nel caso della CT "adjuvante" e "neo-adjuvante" o delle "CT di 2° e 3° linea".
- Una certa libertà di sostituire i derivati del platino con uno qualunque dei nuovi farmaci di terza generazione (gem, taxani, vinorelbina, irinotecan, topotecan,..) attivi sia su NSCLC che su SCLC. La chemioterapia con questi nuovi farmaci viene sempre più spesso utilizzata anche come seconda linea, di solito in monoterapia, e nei pazienti ultrasettantenni.
- Un uso sempre più frequente di schemi di somministrazione ravvicinati (settimanali, bisettimanali).

Prospettive future: nuovi approcci terapeutici, quali la terapia genica, l'utilizzo di anticorpi monoclonali diretti contro fattori di crescita e recettori (es. Herceptin® è in fase di sperimentazione su Ca polmonare; Erbitux® diretto contro EGFR), modulatori della trasmissione del segnale (es. OSI 774 e ZD 1839=Iressa™, già in fase di sperimentazione clinica e diretti contro il recettore tirosina-chinasico EGFR) (Perez-Soler, 2001; Kris et al., 2000), inibitori dell'angiogenesi (con bersaglio preferito il VEGF), vaccini

(es. l'antigene carcinoembrionario peptidico-1 o CAP-1; BEC-2, molecola in fase III di studio creata dall'ingegneria genetica e che imita la forma dell'antigene tumorale GD3 iperespresso nel tumore), modulatori dell'apoptosi, inibitori del ciclo cellulare (es. CI-994, un nuovo farmaco in via di sperimentazione che inibisce la sintesi degli istoni 2A e 2B e la loro deacetilazione) (*Lo Russo et al., 1996*) e nuovi composti farmacologici (es. Pemetrexed Disodico in studio di fase II, dimostratosi attivo nel mesotelioma pleurico) (*Postmus et Green, 1999*) sono in fase di sperimentazione per ottenere un trattamento più efficace che porterebbe ad una prognosi migliore (*Zochbauer- Muller et Minna, 2000; Gridelli et al., 2004*).

ESAME IMMUNOISTOCHEMICO DI MARKERS SPECIFICI IN PREPARATI ISTOLOGICI

Le indagini anatomico-patologiche di routine, alla ricerca di markers specifici di neoplasia polmonare, sono rivolte all'identificazione di:

- **Citocheratine (CK):** (~ 20 tipi diversi), particolarmente importanti per confermare la presenza di un carcinoma. Nel caso specifico, permettono la diagnosi differenziale tra un adenocarcinoma primitivo polmonare da una localizzazione secondaria polmonare di un adenocarcinoma (ad es. colo-rettale). L'adenocarcinoma primitivo polmonare è nella maggior parte dei casi CK 7 positivo e CK 20 negativo. Il contrario avviene per adenocarcinoma colo-rettale (*Rubin et al., 2001*).
- **Enolasi neuro-specifica (NSE), Cromogranina e Sinaptofisina:** sono marcatori specifici del fenotipo neuroendocrino di alcuni istotipi neoplastici quali il tumore carcinoide, il carcinoide atipico, il carcinoma polmonare a piccole cellule e il carcinoma a grandi cellule con carattere neuroendocrino (*Au et al., 2004*).

NEOPLASIE POLMONARI E TELOMERASI

La neoplasia polmonare rappresenta ad oggi un importante problema diagnostico. Il fallimento della terapia, infatti, che si oggettiva nell'alto tasso di mortalità per cancro polmonare a livello mondiale, è essenzialmente imputabile all'assenza di metodiche efficaci di diagnosi precoce (*American Cancer Society, 2002; Tyczynski et al., 2003*). Non è ancora stato riconosciuto, nella pratica clinica, l'utilizzo di un test di screening, come riportato precedentemente, per la diagnosi di carcinoma polmonare in epoca preclinica, che possa consentire un'effettiva riduzione della mortalità (*Bach, 2003*). Solo recentemente, a tale riguardo, da alcuni studi eseguiti su soggetti ad alto rischio è emersa l'efficacia dell'applicazione di TC Spirale e PET come screening (vd. sopra), ma la soluzione del problema diagnostico rimane ancora irrisolta (*Pastorino et al., 2003*). La ricerca di tecniche d'indagine non invasive e l'ottimizzazione del rapporto costo-beneficio, inoltre sono i principali criteri da rispettare nello sviluppo di nuove metodiche diagnostiche. Un nuovo approccio metodologico basato su tecniche di biologia molecolare potrebbe consentire l'identificazione di nuovi e più selettivi markers tumorali. La cancerogenesi è un fenomeno

complesso dove le alterazioni genetiche precedono la comparsa delle alterazioni cito-istologiche (Kaye, 2001). Risulta quindi auspicabile un'ampia valutazione *in vivo* delle relazioni esistenti tra gli eventi biomolecolari del processo di cancerogenesi e le evidenze cito-istologiche finora considerate come "gold-standard" per la diagnosi di neoplasia (Dikmen et al., 2003). Dati consistenti indicano che una serie di eventi molecolari che portano all'attivazione dell'enzima telomerasi sono alla base di un processo di tumorigenesi cellulare (Nugent et Lundblad, 1998; Liu, 1999; Masutimi et Hahn, 2003). Questo enzima, quindi, è un marcatore tumorale la cui determinazione può garantire alta sensibilità e specificità diagnostica (Hiyama et al., 2002; Dhaene et al., 2000; Arinaga et al., 2000).

La telomerasi come marcatore diagnostico e prognostico di tumore polmonare.

L'attività telomerasica è dimostrabile in oltre il 96% dei tumori maligni umani di ogni istotipo, mentre è assente in campioni di tessuto non tumorale ed in neoplasie con prognosi benigna (Blackburn, 1992; Rhyu, 1995; Meeker et Coffey, 1997; Lee et al., 1998; Wang et al., 2001). È stata riscontrata la presenza di attività telomerasica in ~ 85% delle più comuni forme tumorali come il carcinoma della mammella, della prostata, del polmone, del fegato, del pancreas e del colon e ciò sottolinea la funzione chiave di questo enzima nella patogenesi tumorale (Kim, 1997). La telomerasi può risultare già attiva ad uno stadio pre-neoplastico o in altri casi la sua attività aumenta gradualmente in parallelo alla progressione del tumore (Shay et Bacchetti, 1997). hTERT è la subunità catalitica con funzione retrotrascrittasi responsabile dell'attività dell'enzima ed è espressa solo nelle cellule tumorali (ed in altri pochi tipi cellulari quali le cellule staminali, linfociti,..) ed infatti il numero di molecole di mRNA di hTERT in una cellula normale risulta al di sotto della sensibilità di una RT-PCR quantitativa (<0.004 molecole/cellula) (Ducrest et al., 2001). Le altre componenti dell'enzima (hTR e TEP1) sono invece espresse costitutivamente anche in cellule non tumorali anche se a livelli più bassi rispetto alle cellule neoplastiche (Harrington et al., 1997). E' stata dimostrata l'amplificazione del gene di hTERT, considerata come un meccanismo di "up-regulation" positivo dei livelli di telomerasi, osservabile nel 31% delle linee cellulari tumorali e nel 30% dei tumori primari (Meyerson et al., 1997; Soder et al. 1997; Kolquist et al., 1998; Wang et al., 2001; Mergny et al., 2002; Saretzki et al., 2002). Dalle prime indicazioni ottenute circa la capacità della telomerasi di sostenere il processo di immortalizzazione cellulare, si sono moltiplicati gli studi tesi a valutare, *in vivo*, l'attività di questo enzima in campioni di pazienti portatori di neoplasia polmonare. L'espressione del gene di hTERT, quantificato con RT-PCR, è risultata positiva in 16/19 (84.2%) casi di pazienti di carcinoma polmonare (Ma et al., 2002). Le prime analisi dell'attività telomerasica sono state condotte su pezzi istologici di tumori polmonari primitivi (Kim et al., 1994; Hiyama et al., 1995; Wang et al., 2000; Volm et al., 2000; Kumaki et al., 2001; Chen et al., 2002; Hiyama et Hiyama, 2003). Uno studio si basava

essenzialmente su un campione di 136 neoplasie polmonari ottenute da resezione chirurgica. L'attività telomerasica è stata evidenziata nel 80.1% dei 136 casi ed era massima in tutti i campioni relativi a SCLC (11/11). Erano risultati positivi inoltre 4 dei 68 controlli negativi provenienti dagli stessi interventi. Questo studio ha consentito di **evidenziare la positività marcata dell'attività telomerasica nell'istotipo tumorale SCLC rispetto al NSCLC che invece presentava ampia variabilità di tali valori enzimatici** (Hiyama et al., 1995). Dallo studio di pazienti portatori di NSCLC in stadio I di malattia era già stato affermato il ruolo dell'attività telomerasica come fattore prognostico, come indicatore di sopravvivenza e quindi come possibile marcatore tumorale (Marchetti et al., 1999). L'esiguità del campione però non aveva consentito di ottenere dati statisticamente significativi riguardo alla correlazione tra l'attività enzimatica sul pezzo operatorio e l'istotipo tumorale. Non era stata evidenziata alcuna correlazione significativa tra la dimensione della neoplasia e l'entità dell'attività telomerasica mentre era rilevabile nell'analisi grading tumorale-telomerasi. L'attività telomerasica e l'espressione di hTERT risultano incrementare in relazione al fenomeno di cancerogenesi che comprende gli stadi di trasformazione da epitelio bronchiale normale o bronchitico a metaplasia squamosa (33%+) e displasia (35%+) a carcinoma squamocellulare (100%+) (Shibuya et al., 2001). Era già stato infatti dimostrato come la deregolazione dell'attività telomerasica fosse un evento precoce nella patogenesi multistadio dei carcinomi broncogeni e che un'intensa localizzazione focale dell'espressione di hTR, componente ad RNA dell'enzima, nel carcinoma *in situ* potesse indicare un'imminente invasione (Yashima et al., 1997). Uno studio recente attribuisce una significatività statistica come fattore prognostico, in pazienti di NSCLC, all'espressione di mRNA di hTERT, allo stato pN e allo stadio patologico di malattia (stadio p). Inoltre la sopravvivenza a 5 anni per i pazienti con espressione di mRNA di hTERT alta o moderata risulta rispettivamente del 46.9% e 77.9% (Fujita et al., 2003). Altri studi confermano i dati sopra riportati dimostrando come sia l'attività telomerasica che l'espressione di hTERT in NSCLC risultino significativamente correlate con le metastasi linfonodali (N0 vs. N1+2) e come l'attività telomerasica correli con la differenziazione tumorale e lo stadio, ma non con altre variabili clinicopatologiche (Toomey et al., 2001). I pazienti risultati positivi ad hTERT sopravvivevano per un periodo significativamente più breve rispetto ai negativi e la riattivazione della telomerasi sembra assumere il significato di fattore prognostico negativo (Albanell et al., 1997; Hara et al., 2001; Wu et al., 2003). Parallelamente ad un miglioramento delle conoscenze riguardo alla funzionalità e regolazione della telomerasi sono stati condotti studi atti a valutare la presenza dell'attività telomerasica in campioni di escreato, di lavaggio broncoalveolare (Yahata et al., 1998; Arai et al., 1998; Hess et Highsmith, 2002) e su campioni biotipici, tra cui uno riguardante 52 casi di cui 42 clinicamente sospetti neoplastici (7 pazienti allo stadio IIIA, 24 pazienti allo stadio IIIB e 8 allo stadio IV) (Sen et al., 2001). I risultati ottenuti, che suggerivano una

significativa correlazione tra lo stadio di malattia e l'attività telomerastica nell'escreato, nel BAL e nei prelievi biotipici, devono essere però rivisti considerando il tipo di campione, limitato per numero di casi e non rappresentativo per tutti gli stadi di malattia. Nella casistica descritta mancavano inoltre indicazioni relative agli istotipi tumorali. I pazienti con neoplasia polmonare sono stati essenzialmente suddivisi nei due gruppi: SCLC e NSCLC. Su 41 neoplasie diagnosticate, il dosaggio enzimatico della telomerasi nel BAL si è rivelato negativo in 12 pazienti (12/41), di cui 8 erano allo stadio IIIB. Di questi 8 casi, negativi inspiegabilmente all'analisi dell'attività telomerastica condotta sul BAL, 7 campioni di escreato risultavano positivi alla telomerasi e di questi solo 4 sono risultati positivi per cellule neoplastiche all'analisi citologica. In conclusione per **lo stadio di malattia IIIB l'analisi dell'escreato è risultata più efficace per la ricerca dell'attività telomerastica rispetto all'utilizzo del BAL o all'analisi citologica**. La sensibilità, specificità e accuratezza diagnostica della determinazione dell'attività telomerastica in tale studio erano risultate rispettivamente dell'81.6%, 100% e 86.5% per i campioni di escreato, 68.4%, 100% e 76.9% per i BAL e 86.8%, 100% e 88.1% per le biopsie broncoscopiche. Uno studio più recente condotto dallo stesso gruppo ha evidenziato attività telomerastica in 58.5% di campioni di escreato, 70% di BAL e 74% di biopsie broncoscopiche, evidenziando la potenzialità di tale enzima come marcatore diagnostico non invasivo (*Sen et al., 2002*). La possibilità di utilizzare un marcatore tumorale come la telomerasi nello studio e nella diagnostica delle neoplasie polmonari assume particolare interesse se si pensa alla difficoltà diagnostica che si incontra in caso di primitività polmonari periferiche. In questi casi, infatti, l'indagine broncoscopica non sempre garantisce l'ottenimento di materiale idoneo per la valutazione cito-istologica, per problemi anatomici e strumentali. In queste condizioni il materiale idoneo nella valutazione della composizione cellulare del polmone profondo potrebbe essere quello ottenuto dal lavaggio broncoalveolare. Tale metodica è stata valutata in un gruppo di 29 pazienti sottoposti a broncoscopia per sospetta neoplasia polmonare. Sono stati diagnosticati 22 tumori polmonari e 7 lesioni di natura non neoplastica. Tra le patologie benigne è stato riscontrato 1 ascesso polmonare e 1 caso di tubercolosi. I pazienti in studio sono stati classificati in base alla istologia tumorale, e si è valutata l'entità dell'attività telomerastica e la positività all'analisi citologica. Per la prima volta, uno studio sulla attività telomerastica legata alle neoplasie polmonari riportava una distinzione tra i vari tipi istologici di malattia e la relativa espressione enzimatica. Purtroppo l'esiguità del campione non permetteva analisi di correlazione tra i dati ottenuti. Nei 12 pazienti con carcinoma spinocellulare l'espressione dell'attività telomerastica era evidente solo in 10 di essi (83.3%) e degli 8 adenocarcinomi, il 50% (4) esprimevano l'enzima. 2 SCLC diagnosticati presentavano attività telomerastica. In questo studio l'attività telomerastica in campioni di BAL era positiva in tutti e 13 i tumori visibili endoscopicamente (100%), mentre il BAL effettuato per neoformazioni polmonari non visibili endoscopicamente risultava positivo all'attività telomerastica in soli 3

casi dei 9 totali (*Dikmen et al., 2003*). Questo studio ha inoltre confermato il dato riportato in letteratura che indica la possibile presenza di falsi positivi con percentuali variabili tra il 18% e il 31% (*Sen et al., 2001*). L'interesse per la diversa espressione dell'enzima nei differenti istotipi neoplastici polmonari nasce proprio da questi studi iniziali che non hanno permesso di ottenere dati statisticamente significativi circa la correlazione istotipo-attività telomerasica ma che comunque hanno cominciato a sottolineare la presenza di diversi livelli di positività. A questo riguardo **è stata dimostrata una marcata positività degli SCLC, una variabilità di espressione negli NSCLC e l'assenza di attività in specifiche forme neoplastiche quali il tumore carcinoidale** (*Sarvesvaran et al., 1999*). L'adenocarcinoma, caratterizzato dalla minore attività telomerasica rispetto agli altri istotipi, ed il carcinoma a cellule squamose esibiscono una colorazione immunoistochimica per hTERT o nucleare o nucleolare a differenza della colorazione diffusa nucleare osservabile per la maggior parte dei carcinomi basaloidi ed in tutti i SCLC. Inoltre l'espressione telomerasica risulta minore nello stadio I di NSCLC rispetto a tutti gli altri stadi ed una colorazione nucleolare correla con una minore sopravvivenza (*Marchetti et al., 2002; Lantuejoul et al., 2004*). In conclusione questa ricerca evidenzia una valenza prognostica della telomerasi, la cui espressione e pattern risultavano diversi per le varie classi istopatologiche di tumori polmonari. Il tumore di tipo carcinoidale, a basso grado di malignità, presenta un'eterogeneità di espressione della telomerasi, in associazione alla presenza o meno di delezioni alleliche in corrispondenza di geni localizzati in 10p o 3p che agiscono indipendentemente come soppressori della componente ad RNA telomerasica (*Miura et al., 2001; Iniesta et al., 2004*). Uno studio ha dimostrato come le tipiche cellule carcinoidi, telomerasi negative (*Yashima et al., 1997*), siano mortali in stadio pre-M2, mentre le atipiche cellule carcinoidi, quelle del carcinoma polmonare neuroendocrino a larghe cellule e del SCLC siano immortali in stadio post-M2 e presentino alti livelli di attività telomerasica (*Gomez-Roman et al., 2000*). Recentemente, a tale riguardo, si stanno conducendo studi mirati alla valutazione dell'espressione differenziale in tumori neuroendocrini polmonari (*Zaffaroni et al., 2003*). Sono stati a tal fine valutati 38 casi, di cui sono risultati telomerasi positivi 14 dei 15 (93%) SCLC, 7 degli 8 (87%) carcinomi a grandi cellule con caratteristiche neuroendocrine e solo 1 su 15 (7%) dei tumori carcinoidi tipici. Altri autori hanno dimostrato come un alto livello del DNA del gene di hTERT circolante libero nel plasma, quantificato con la metodica della real-time PCR, sia da considerarsi un grande fattore di rischio in un'ottica di screening e chemioprevenzione, essendo stato riscontrato così elevato in pazienti di carcinoma polmonare (*Soria et al., 2002; Sozzi, 2003*). La determinazione dell'attività telomerasica è stata compresa inoltre nello studio della malattia minima residua in pazienti con tumori solidi, tra cui il tumore polmonare (*Böckmann et al., 2001*).

Metodi di studio dell'attività telomerasica : il metodo più utilizzato per l'identificazione e quantificazione dell'attività telomerasica è il **"TRAP assay"** radioattivo. Con questa tecnica l'attività

enzimatica può essere evidenziata in campioni costituiti anche solo da una decina di cellule attive, dimostrandosi una metodica ad alta sensibilità (*Piatyszek et al., 1995*). Per evitare falsi positivi derivanti dalla contaminazione di campioni sospetti tumorali da parte di cellule non tumorali esprimenti la telomerasi, soprattutto linfociti, è consigliabile utilizzare estratti derivati da 1000 cellule per test con il razionale che **l'estratto di 1000 cellule da linfociti maturi non dimostra attività telomerasica rilevabile** (*Iwao et al., 1997; Hiyama et al., 1995*). Inoltre, alcuni tessuti contengono inibitori della reazione di amplificazione dei prodotti dell'attività telomerasica da parte della Taq polimerasi, quali ad esempio l'emoglobina, mucine, RNAsi e proteasi, inficiando il risultato finale sperimentale (*Shay et Wright, 1996*). Recentemente, è stata sviluppata la tecnica di **Real Time PCR** che permette un'analisi quantitativa, con rivelazione a fluorescenza (**Syber Green**), dell'attività enzimatica e che si fonda sugli stessi principi sperimentali del protocollo TRAP (*Hou et al., 2001; De Kok et al., 1999*).

Le **tecniche di immunistoichimica** permettono di evidenziare la presenza *in situ* della componente proteica nucleare **hTERT** in un campione istologico di tessuto deparaffinato, anche nelle condizioni in cui sia poco espressa. I livelli di attività telomerasica nei tessuti tumorali analizzati in immunistoichimica si ottengono dal rapporto tra il numero di cellule telomerasi positive ed il numero di cellule telomerasi negative, con possibili difficoltà derivanti dall'analisi quantitativa dei risultati ottenuti (*Hiyama et al., 2001; Hiyama et Hiyama, 2002; Keith, et al., 2003*). Le varie strategie di identificazione dell'attività telomerasica vanno comunque affiancate alle tecniche cito-istologiche che rappresentano l'indagine "gold-standard" nella tradizionale diagnostica oncologica. Uno studio condotto su lavaggi bronchiali ha dimostrato una sensibilità del TRAP assay *in situ* dell'82% vs il 41% dell'esame citologico (*Yahata et al., 1998*). Un altro gruppo, nello stesso periodo, aveva dimostrato come la combinazione delle 2 tecniche di analisi fosse in grado di individuare 17/23 (74%) casi di tumore polmonare analizzando lavaggi bronchiali, mentre l'esame istologico da solo era in grado di evidenziarne appena 10/23 (43%) ed il TRAP assay da solo il 70% (*Xinarianos G. et al., 2000*). Un valore simile di accuratezza diagnostica (87% e 86,5%), derivante dalla combinazione dell'esame citologico e del test dell'attività telomerasica, è stato ottenuto da uno studio condotto su biopsie bronchiali derivanti da casi sospetti di carcinoma polmonare periferico (*Freitag et al., 2000*) e da un'analisi condotta su 58 campioni di BAL derivati da tumori primari polmonari (*Dikmen et al., 2003*), rispettivamente. In quest'ultimo studio la sensibilità della determinazione dell'attività telomerasica era risultata pari al 78.4% (29/37; accuratezza diagnostica del 75.8%) rispetto al 64.7% (24/29) dell'esame citologico (*Arai et al., 1998*) e risultarono positivi alla telomerasi anche 2 casi di sarcoidosi e 2 di tubercolosi. La sensibilità e specificità dell'indagine citologica nei due gruppi (neoplasia

vs no neoplasia) sono risultate pari a 54.4% e 100% rispettivamente, mentre per la determinazione dell'attività telomerasica rispettivamente del 72.7% e 85.7%.

SCOPI DELLA RICERCA

- Valutare la possibilità di dosare l'enzima telomerasi in campioni biologici ottenuti da lavaggi broncoalveolari e da tessuti patologici tumorali derivati da pezzi chirurgici.
- Valutare il contributo diagnostico della telomerasi nell'iter stadiativo del paziente.
- Valutare la possibilità di utilizzo della telomerasi per seguire in modo non invasivo l'evoluzione della malattia.
- Valutare l'efficacia del trattamento terapeutico eseguito.

MATERIALI E METODI

Pazienti e criteri di inclusione: i pazienti erano ospedalizzati presso la struttura Ospedale "Maggiore della Carità" di Novara. Il *criterio principale di inclusione* nello studio era la presenza di una sospetta neoplasia periferica polmonare, soprattutto se non chiaramente definibile dal quadro radiologico. Pazienti fumatori, ex-fumatori e non fumatori sono stati inclusi, sia ♀ che ♂, di qualsiasi età. I pazienti con documentazione TAC, eseguita sia presso la struttura che in strutture esterne erano sottoposti ad intervento di endoscopia toracica (FBS fibrobroncoscopia), lavaggio broncoalveolare (BAL), broncoaspirato ed agoaspirato (TBNA) nel reparto di Pneumologia della struttura stessa (Resp. Dott. Piero Balbo). Il *principale criterio di esclusione* è stato la presenza di lesione visibile endoscopicamente. Il materiale diagnostico utilizzato nello studio rientrava nella normale routine prevista nei casi di sospetta neoplasia polmonare. **E' stato quindi esaminato solo il materiale in eccesso rispetto alle necessità diagnostiche della struttura.**

Procedure: le fibrobroncoscopie sono state eseguite dall' anatomo-patologo (Dott.ssa Silvia Cristina) che ne ha curato l'esame estemporaneo del campione prelevato con agoaspirazione. Il materiale diagnostico si componeva, a seconda del caso clinico, di agoaspirato su lesione polmonare, agoaspirato su linfonodi ilo-mediastinici (sottoaortici, sottocarenali, paratracheali). Per completare il quadro diagnostico venivano anche eseguiti BAL e broncoaspirato. **Il BAL è stato eseguito selettivamente nelle strutture bronchiali del segmento tributarie dell'area di localizzazione della lesione. Al fine di evitare contaminazioni ematiche dei campioni è stata data precedenza al BAL rispetto alle altre procedure.** Il paziente veniva preparato ed anestetizzato localmente e veniva quindi introdotto per via orale il broncoscopio e incuneato (wedge position) nel segmento bronchiale interessato che veniva quindi irrorato con un volume variabile tra i 50 - 100 ml di soluzione fisiologica a 37°C, in funzione della localizzazione della lesione e dell'accessibilità bronchiale. Il recupero del liquido di lavaggio (BAL) veniva

effettuato con continua e costante aspirazione in siringa sterile ed immediatamente processato per le successive analisi. Il broncoaspirato rappresentava il materiale ricavato dalla continua aspirazione durante tutta la procedura endoscopica delle secrezioni presenti nell'albero bronchiale. La procedura veniva seguita attraverso controllo fluoroscopico. I pazienti eleggibili per la chirurgia (bassa stadiazione, buone condizioni generali) sono stati sottoposti ad intervento (lobectomia) presso la Clinica di Chirurgia Generale (Dir. Prof. Marcello Garavoglia) dalla Prof. Caterina Casadio. Il pezzo operatorio, incluso in paraffina, è stato quindi processato ed analizzato presso il Servizio di Anatomia Patologica dell'Ospedale "Maggiore della Carità" di Novara (Dir. Prof. Guido Monga) per la diagnosi istologica definitiva. A partire da questo materiale incluso sono stati anche allestiti i vetrini (Dott.ssa G. Nicosia) per lo studio dell'espressione dell'enzima telomerasi (hTERT) con metodica immunisto chimica.

Estrazione e purificazione dell'enzima telomerasi dalle cellule ottenute mediante BAL e

broncoaspirato: per l'estrazione dell'enzima telomerasi dai BAL si diluiva il liquido di lavaggio di ogni paziente con uguale volume di soluzione fisiologica. Dopo aver trasferito la soluzione in provette sterili da centrifuga, i campioni erano centrifugati a 400 g per 10 minuti a 4 °C, separando così il pellet di cellule dal liquido di lavaggio. Dopo aver decantato il surnatante, il pellet di cellule veniva risospeso su ghiaccio con 5 ml di tampone fosfato isotonico sterile (pH 7.39, PBS). Le cellule venivano nuovamente centrifugate a 200 g per 10 minuti a 4 °C. La metodica di estrazione utilizzata si basava fondamentalmente sul metodo descritto da Kim (*Kim et al., 1994*). Il pellet veniva quindi risospeso con uno specifico tampone freddo (Washing Buffer), composto da HEPES 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM e DTT 1 mM. Si centrifugava a 200 g a 4 °C per 10 minuti e dopo aver accuratamente aspirato il surnatante, il pellet così ottenuto veniva risospeso con il tampone di lisi freddo, composto da Tris-HCl 10mM pH 7.5, MgCl₂ 1mM, EGTA 1mM, 0,5% CHAPS, 10% glicerolo, PMSF 0,1mM, 2-mercaptoetanolo 5mM. Tutti i sali ed i reagenti sono stati acquistati presso Sigma (Sigma Aldrich, USA). La lisi veniva effettuata a 4 °C per 30 minuti con continua agitazione su vortex. I campioni venivano quindi centrifugati a 20.400 g per 30 minuti, a 4° C. Veniva quindi prelevata la frazione che conteneva l'enzima semipurificato ed attivo e conservata a - 80 °C. Poiché la quantità di enzima telomerasi presente nella frazione era proporzionale al contenuto proteico della frazione stessa, si procedeva alla quantificazione delle proteine totali. A tal fine si è utilizzato una metodica standard micro-Lowry modificata (Promega, USA), e le proteine venivano quantificate per via spettrofotometrica (Beckman DU-600). Sulla base dei valori di concentrazione così ottenuti, tutti i campioni venivano diluiti ad una concentrazione proteica finale uguale (1 µg/µl).

Determinazione dell'attività telomerasica con TRAP assay: per determinare la presenza di attività telomerasica nelle frazioni cellulari derivate da BAL e broncoaspirato sono state utilizzate **2 metodiche**

per permettere una più accurata valutazione di ogni campione. **La prima metodica**, un protocollo detto **TRAP** (telomeric repeat amplification protocol) (Kim et al., 1994) permetteva un dosaggio semiquantitativo utilizzando 2 oligonucleotidi sintetici standard (TS e CX). La reazione di amplificazione veniva rivelata attraverso l'incorporazione di (alfa³²P)dCTP (Amersham, UK) e la successiva risoluzione veniva effettuata su gel di poliacrilamide (PAGE). Un controllo interno, l'ITAS (internal telomerase activity standard, 150 bp con i terminali omologhi ai primers TS e CX) ha consentito la misura quantitativa dell'attività enzimatica, con densitometria (Phosphor Imager, BioRad, UK). Questa metodica si compone di **3 fasi**:

1. fase di elongazione: utilizza 0.5-1 µg di lisato cellulare ed è basata sulla capacità della telomerasi di riconoscere ed elongare *in vitro* un oligonucleotide sintetico TS (telomerase substrate, 5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'). La reazione viene condotta a 23°C in presenza delle 4 basi nucleotidiche trifosfate. In questa fase l'enzima aggiunge un numero variabile di esameri TTAGGG al TS, telomero-mimetico, consentendone un allungamento per un multiplo di 6 basi alla volta.

2. fase di amplificazione : i prodotti risultanti dalla fase di elongazione sono amplificati con una reazione PCR (polimerase chain reaction). I primers utilizzati nella reazione erano lo stesso TS (*upstream primer*) non elongato ed un oligonucleotide, denominato CX (5'-CCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3')(*downstream primer*) (Kim et al., 1994). Il CX è stato disegnato in modo da essere complementare a 4 ripetizioni telomeriche (5'-TTAGGG)₄, ma con opportune sostituzioni di base (mismatch), in modo tale da aumentare la specificità di legame con il terminale 3' della sequenza TS-(TTAGGG)_n elongata, evitando un appaiamento casuale all'interno del TS elongato (Falchetti et al., 1998). L'amplificazione con PCR (ThermoHybaid Gradient Px2) prevedeva 35 cicli (94°C per 30", 50°C=T di annealing per 30", 72°C per 90"). Il tampone di reazione era così composto: Tris-HCl 20 mM pH 8.3, KCl 63 mM, MgCl₂ 1.5 mM, TWEEN 20 0.005 %, EGTA 1 mM, BSA 0,1 mg/ml, TS 0,1 µg; dATP, dCTP, dTTP, dGTP ognuno 50 µM; Taq-polimerasi 2 U (Roche, Germania), lisato cellulare 1 µl (1µg), [α³²] dCTP 2 µCi, CX 0,1 µg. Il primo ciclo consentiva alla Taq-polimerasi di costruire la sequenza complementare al solo frammento di TS elongato (1+n esameri), partendo dall'estremità 3' del CX. In questo modo si ottiene un DNA a doppia catena che sarà il template (stampo) per i successivi cicli di amplificazione in cui verranno utilizzati il TS non elongato ed il CX come primers.

3. risoluzione con elettroforesi su gel di poliacrilamide : per risolvere i frammenti prodotti nel TRAP sono stati utilizzati gel di poliacrilamide non denaturanti (PAGE). I componenti per la preparazione del gel erano Acrilamide/bis acrilamide 19:1 al 12 % finale, TBE (tampone tris-base 89 mM, borato 89 mM, EDTA 2mM) 1x, TEMED 0.08 %, e APS 0.3 mg/ml. Il buffer di preparazione e corsa era composto da

tampone TBE (Tris-base 89 mM, acido borico 89 mM, EDTA 2mM). Il gel veniva corso con una corrente costante ad una potenza di 60 W. I campioni erano preparati in un tampone di carica (loading buffer) così composto: TBE 1x, glicerolo 50 %, blu di bromofenolo 0.25 %, xilen-cianolo 0.25 %. La corsa durava circa 2 h, garantendo una buona separazione delle bande di frammenti del DNA [TS+(TTAGGG)_n]. Il sistema elettroforetico era un Hoefer SQ3 (Pharmacia Biotech, Svezia). Il gel era spesso 0.75 mm ed il pettine utilizzato, a base piatta, permetteva di caricare 8 µl di campione. Il gel veniva passato su carta Whatman 3mm Chr (Whatman, UK) ed essiccato sotto vuoto (Gel-Dryer 583, BioRad). Per la rivelazione delle bande ottenute e per la quantificazione del segnale è stato utilizzato un densitometro (Phosphor Imager GS-250, Bio-Rad) e lo schermo di acquisizione utilizzato era Molecular Imager Imagin Screen BI (BioRad). L'intensità della radioattività delle singole bande era direttamente proporzionale alla quantità di DNA amplificato che aveva incorporato [α^{32}]dCTP. Veniva quindi rilevata l'intensità complessiva di tutta la corsa elettroforetica ottenuta in ogni campione e l'intensità era espressa come **volume di attività/area di analisi**. L'intensità complessiva della corsa elettroforetica era direttamente proporzionale all'attività telomerasica.

La seconda metodica consisteva nel **dosaggio dell'attività telomerasica con real-time quantitative PCR (TRAP-RTQ-TRAP)**: deriva dal protocollo TRAP ma si avvale di uno strumento di amplificazione e contemporanea rivelazione, l'ABI PRISM 7700 Sequence Detector System. La procedura secondo quanto descritto da Wege (*Wege et al., 2003; Giulietti et al., 2001*) prevedeva l'utilizzo di: un oligonucleotide telomero mimetico TS (5'- AATCCGTCGAGCAGAGTT-3') 0.1 mg, un anchored downstream primer ACX (5'-GCGCGG(CTTACC)₃CTAACC-3'), 1 U di Ampli-Taq Gold polimerasi, il SYBR Green PCR Master Mix (PE Applied Biosystems) (composto da 2.5 mM di ogni base dNTP, 15 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 0.2 µg della proteina T4) e 0.5 µg di lisato ottenuto da BAL o dal broncoaspirato. La reazione era condotta in una piastra a 96 pozzetti in volume finale di 25 µl per campione. La soluzione veniva prima incubata a 25 °C per 20 minuti al fine di permettere alla telomerasi eventualmente presente nell'estratto cellulare di allungare il primer TS con gli esameri TTAGGG, in seguito avveniva un primo stadio a 95 °C per 10 minuti, necessario per l'attivazione dell' AmpliTaq Gold polimerasi, e quindi iniziava l'amplificazione con 40 cicli (95 °C per 20", 50°C per 30", 72 °C per 90") al termine della quale avveniva l'ultimo stadio, detto di dissociazione, a 60°C per 30 minuti. Il SYBR Green, un marcante fluorescente, è noto legarsi al DNA doppia elica quindi quando nuovi ampliconi sono prodotti grazie alla PCR, dal suo legame con questi si genera un segnale fluorescente, raccolto ed analizzato con il software del Sequence Detector (Versione 1.6; PE Applied Biosystems) durante la fase di estensione di ogni ciclo di amplificazione. **Un segnale di fluorescenza era ritenuto significativo (Ct)**

quando era superiore alle 10 deviazioni standard del valore medio di fluorescenza considerato come rumore di fondo. Come rumore di fondo solitamente si utilizzava quello misurato nei primi cicli di amplificazione, e più precisamente tra il ciclo 3 ed il 15. L'attività telomerastica nei campioni era calcolata come valore Ct (valore di ciclo di innesco di amplificazione), e cioè tanto più era intensa, tanto più il valore di Ct era basso. In tutte le reazioni sono stati inclusi 2 controlli interni: un vero positivo rappresentato da un lisato preparato da un linea di cellule tumorali umane MCF-7, utilizzato a differenti concentrazioni di proteine comprese tra 1 µg e 0.0016µg, ed un vero negativo ottenuto conducendo la reazione con tutti i sali necessari ma in cui non veniva aggiunto alcun lisato cellulare. Tutti i campioni venivano dosati in duplicato ed i controlli interni permettevano di costruire una curva standard. I valori di cicli di innesco dell'amplificazione (Ct) erano calcolati a partire dal plot semilogaritmico di amplificazione (incremento logaritmico della fluorescenza versus il numero del ciclo corrispondente) e comparato con la curva standard generata dalle diluizioni seriali delle cellule telomerasi-positivo MCF-7 (attività corrispondente a 1000, 100, 10, 1 cellule). L'attività della telomerasi era espressa come relativa alle cellule MCF-7 (RTA), e cioè come numero teorico totale di cellule tumorali telomerasi-positivo presenti nei lisati. L'analisi delle **curve di dissociazione** (T di melting) ottenute mediante un ciclo condotto a 60°C per 20 minuti al termine dei cicli di amplificazione consente di determinare la specificità dei prodotti di amplificazione (*Ririe al., 1997; Wilhelm et al., 2000; Vandesompele et al., 2002*).

Esame immunoistochimico della telomerasi dei preparati istologici: per l'esame immunoistochimico, è stata messa a punto una metodica originale. I preparati istologici venivano deparaffinizzati e reidratati mediante scale di xilene ed etanolo. Per lo smascheramento dell'antigene nucleare hTERT della telomerasi il vetrino veniva trattato con tampone citrato 0.07 M caldo (6 cicli da 5 minuti a 650 W con microonde). I vetrini venivano raffreddati per almeno 20 minuti e passati in PBS per 2 minuti. A questo punto venivano trattati con H₂O₂ al 3% per 8 minuti, al fine di eliminare le perossidasi endogene, quindi lavati con PBS per 2 volte per 3 minuti ed incubati per 24 ore a temperatura ambiente con l'anticorpo primario policlonale anti-human TERT (H-231 Santa Cruz Biotechnology Inc, USA) diluito 1:25 con diluente DAKO (DAKO ChemMate, DAKO A/S Danimarca). Al termine dell'incubazione, i vetrini venivano lavati 2 volte in PBS per 5 minuti ed incubati con l'anticorpo linker biotinilato per 15 minuti, secondo le istruzioni del kit di rivelazione (LSAB+ peroxidase, DAKO). All'anticorpo secondario seguivano due lavaggi con PBS e un'incubazione con streptavidina marcata con perossidasi per 15 minuti. Il colore veniva sviluppato, dopo 2 lavaggi di 3 minuti con PBS, mediante l'incubazione di 4 minuti con diaminobenzidina. Dopo un lavaggio con acqua corrente per almeno 5 minuti i vetrini venivano colorati con ematosilina di Mayer per 1 minuto. Al termine del lavaggio con acqua corrente per almeno 3 minuti i vetrini venivano montati ed erano pronti per l'esame al microscopio. L'immunoistochimica di routine

prevedeva la determinazione delle citocheratine (CK 7 e CK 20), l'enolasi neuro-specifica (NSE), la cromogranina e la sinaptofisina.

Analisi statistica: le variabili considerate in questo studio sono state categorizzate come segue: stadio (I-II-III-IV), tipo istologico, grado istologico (G1-G2-G3), malattia residua, attività telomerasica, età, fumo, metastasi e linfonodi interessati dalla malattia. L'associazione tra l'attività telomerasica, stadio tumorale, tipo e grado istologico, è stata valutata utilizzando la regressione logistica. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il programma Excel (Microsoft, US).

RISULTATI E DISCUSSIONE

I pazienti considerati nello studio sono stati complessivamente 57, 48 uomini e 9 donne.

Sesso	Età ≤ 50	50 < Età ≤ 60	Età >60
Maschile	4	10	34
Femminile	1	0	8

Tabella 5. Suddivisione dei pazienti per fasce di età (minima=42 anni; massima=81anni) e per sesso.

Uomini	n°	Patologia
Età ≤ 50	4	2 negativi (1 aspergilloso, 1 silicotubercolosi) 1 neoplasia polmonare primitiva 1 metastasi polmonare da carcinoma vescicale
50 < Età ≤ 60	10	1 negativi 7 neoplasie polmonari primitive 1 timoma 1 metastasi polmonare da carcinoma renale
Età >60	34	2 negativi (1 ascesso polmonare, 1 lesione aspecifica non evolutiva) 30 neoplasie polmonari primitive 2 linfomi
Donne		
Età ≤ 50	1	1 negativa (sarcooidosi)
50 < Età ≤ 60	0	
Età >60	8	2 negativi (1 fibrosi interstiziale idiopatica) 6 neoplasie polmonari primitive

Tabella 6. Patologie considerate nello studio. Ripartizione per sesso ed età dei pazienti.

Per quanto riguarda l'abitudine al fumo di sigaretta sono stati individuati 3 gruppi di pazienti (**Tabella 7**).

Fumatore	Sesso		Portatori di neoplasia polmonare primitiva	
	Maschi	Femmine	Maschi	Femmine
NO	5	5	2	3
Ex	18	1	17	1
SI	24	3	19	2

Tabella 7. Attitudine al fumo dei pazienti inclusi nello studio.

Per descrivere secondo parametri standard il consumo di tabacco si è utilizzata la quantificazione del cosiddetto “pack-year” (Nyberg *et al.*, 1998) che si esprime come il n° di anni di fumo moltiplicato per il n° di pacchetti di sigarette fumati al giorno.

Patologia neoplastica	n° casi	Tipo di patologia e “pack-year”
Assente	9	silicotubercolosi (15) silicosi (ex2) ascesso polmonare (90) aspergillosi (64) fibrosi interstiziale (0) sarcooidosi (25) 3 lesioni non evolutive (0,0,0)
SCLC (centrale) (small cell lung cancer)	1	Microcitoma (42)
NSCLC (non-small cell lung cancer) Centrali	5	Carcinoma spinocellulare (50,30,60,30,30)
Periferici	38	10 Adenocarcinoma (15,0,30,0,60ex7,40,0,50,40,52) 12 Spinocellulare (40ex5,50ex9,ex3,ex12,40ex10,30ex10,0,40,75,ex10,30,30ex3) 6 Grandi cellule (30,ex3,30,36,ex16,31.5) 1 Carcinoide (0) 2 Ca Bronchiolo-alveolare (30ex20,30ex15) 7 NSCLC non tipizzato (ex8,20ex15,50,50ex7,40ex10,ex2)
Timoma	1	A cellule fusate (15)
Linfoma	1	(45)
Metastasi polmonari	2	1 MTS da carcinoma renale (0) 1 MTS da carcinoma vescicale (20)

Tabella 8. Distribuzione delle patologie e attitudine al fumo. Nelle parentesi sono indicati i “pack year” di ogni singolo paziente. Nel caso di ex fumatori è stato riportata una dizione *n-ex-m*, dove *n*, se indicato, era noto e indicava il numero di “pack year”, mentre *m* il numero di anni trascorsi senza fumare. L’esiguità del numero di pazienti inclusi in questo studio non permette di effettuare ancora una statistica significativa, quindi i dati sono riportati nella tabella seguente con scopo puramente descrittivo.

1 “pack-year” = 7300 sigarette, e dato che una sigaretta contiene ~ 1 g di tabacco, esso equivale a circa 7.3 kg di tabacco. I non fumatori sono stati qualificati come “pack-year” uguale a 0. Sono stati considerati ex-fumatori quelli che hanno dichiarato di non fumare da almeno 2 anni, mentre per il calcolo dell’esposizione complessiva al fumo si è comunque adottato il parametro “pack-year”. I dati in **Tabella 8**

evidenziano un'alta correlazione tra l'attitudine al fumo e le neoplasie (NSCLC e SCLC), anche in ex-fumatori.

I pazienti sono stati stadiati attraverso l'esecuzione di differenti indagini. Quelle radiologiche, RX torace e la tomografia toracica (TAC) sono servite per avere una indicazione circa l'estensione loco-regionale della malattia a livello polmonare e linfonodale. Le indagini broncoscopiche, stadiative e diagnostiche hanno fornito materiale per lo studio citologico o istologico del tessuto patologico. Per completare le indagini stadiative è stata anche valutata la possibile estensione di malattia in sede extratoracica, attraverso l'esecuzione di TAC addome, TAC encefalo e scintigrafia ossea "total body". La classificazione TNM utilizzata fa riferimento alla 5° edizione del Manuale TNM (*Sobin, Wittekind Ch eds - UICC: TNM Classification of Malignant Tumors, 5th. ed. John Wiley, 1997, New York*). Sono stati esclusi, tra tutti i 57 casi presi in studio, un paziente portatore di neoplasia polmonare diagnosticata, poiché l'esecuzione del lavaggio bronco-alveolare non è avvenuto nel lobo polmonare corretto (quello della neoplasia) ed altri 2 casi in cui le lesioni polmonari si sono rivelate essere metastasi da neoplasia primitiva non polmonare. E' stato altresì incluso un paziente a cui non era stato praticato un lavaggio selettivo dei rami tributari alla lesione polmonare ma solo un aspirato non selettivo delle secrezioni provenienti da tutto l'albero bronchiale. I risultati riferiti alla positività telomerastica del BAL sono stati espressi come: negativo, blando positivo (+ / -), sicuramente positivo (+), molto positivo (++) . Questi dati, definiti complessivamente come TRAP assay, sono stati ottenuti dalla comparazione tra i dati misurati con la metodica **TRAP tradizionale (Figura 2)** e quella **TRAP-RTQ-PCR (Figura 3.a. e 3.b.)**.

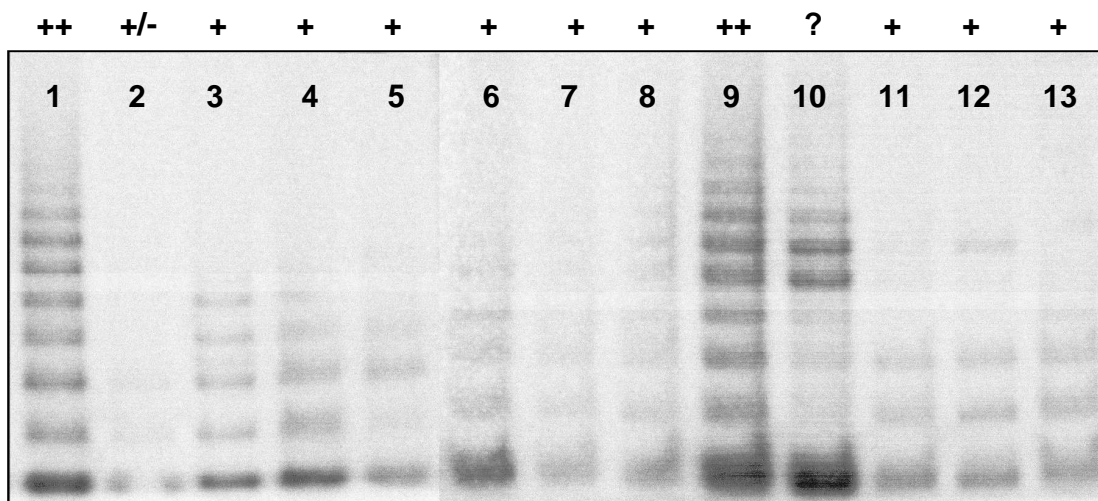


Figura 2. Esperimento tipico di TRAP tradizionale che mostra i prodotti di amplificazione di frammenti elongati con 6 basi ripetute (TTAGGG) dovuti all'attività telomerastica. L'intensità complessiva delle bande in ogni colonna correla con l'attività complessiva della telomerasi contenuta in 1 µg di proteina di ogni campione. Colonna 1: controllo vero positivo (estratto da linea tumorale MCF-7). Colonna 2, paziente con blanda positività (+ / -), colonne 3-8 e 11-13 sicuramente positivi (+). Colonna

9, paziente molto positivo (++) e Colonna 10, caso dubbio da riconfermare con ripetizione dell'esperimento e TRAP-RTQ-PCR.

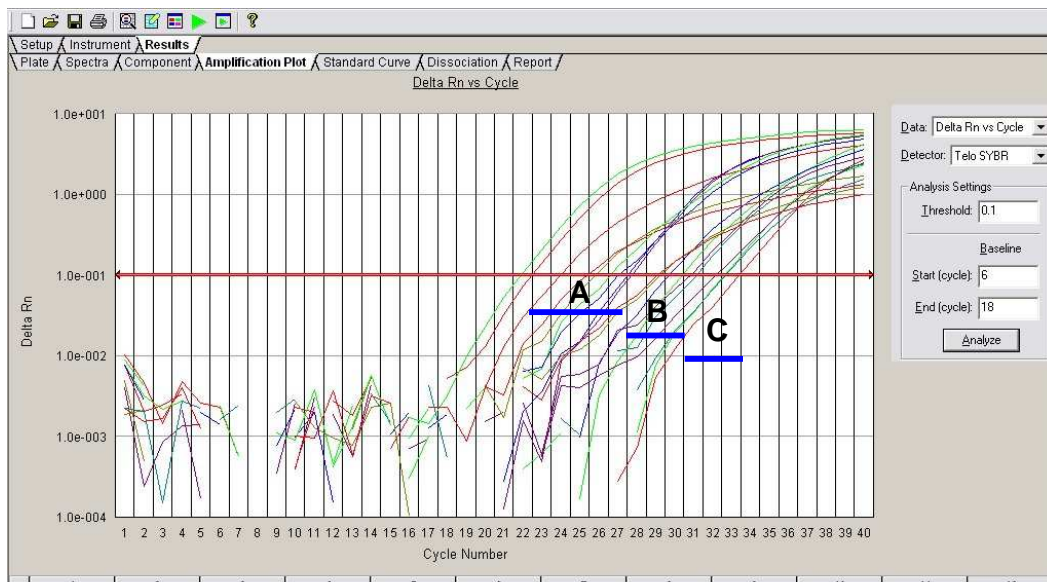


Figura 3.a.

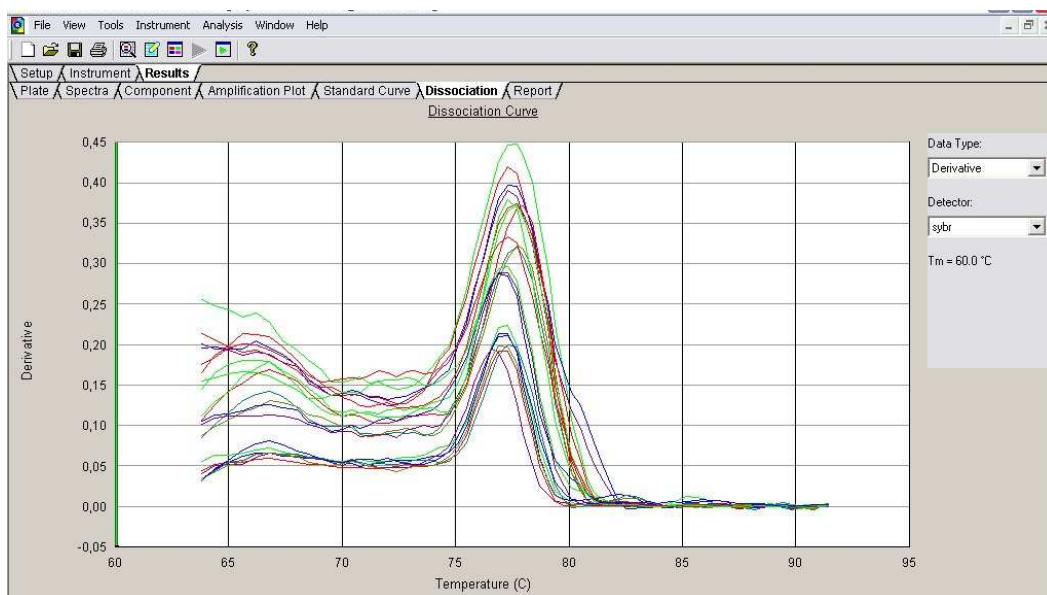


Figura 3.b.

Figura 3a. e 3.b. Esperimento tipico di dosaggio telomerastico attraverso TRAP-RTQ-PCR. La figura 3.a. mostra il risultato dell'amplificazione dei prodotti della telomerasi nei campioni di BAL. L'attività dell'enzima era proporzionale alla sua capacità di formare prodotti in grado di essere amplificati per mezzo di PCR. Il tempo Ct (vd. *Materiali e metodi*) era inversamente proporzionale alla quantità di enzima presente nei campioni. Le zone indicate sono rispettivamente: **zona A**,

comprende i valori inclusi nella curva standard ottenuta amplificando i prodotti di un vero telomerasi-positivo (linea tumorale MCF-7, quantità di lisato compreso tra 1 µg e 0.0016 µg di proteine totali). Se il Ct calcolato era compreso tra 21 e 25 il campione era considerato ++, mentre se Ct era compreso tra 26 e 27 era considerato +. La zona B e C comprende i valori ottenuti tra la massima diluizione e il controllo vero-negativo, in cui non vi era telomerasi attiva. La **zona B** è il valore soglia di rivelazione sicura (scarsa positività + / - , **Ct 27**), mentre la **zona C** comunque necessita di una successiva verifica ma viene considerata telomerasi-negativa (- , **Ct > 30**).

Dall'analisi delle curve di dissociazione (**Figura 3.b.**) era possibile confermare l'alta specificità della determinazione dell'attività telomerasica di cellule derivanti da BAL, infatti i picchi di ogni curva corrispondenti ai singoli campioni risultavano sovrapposti, ben definiti ed unici.

Le seguenti **Tabelle 9.a., b., c.** permettono di evidenziare alcuni aspetti importanti, descrivendo i casi (11) con interessamento patologico polmonare che la diagnostica tradizionale ha indicato come pazienti non portatori di una neoplasia polmonare primitiva.

Casi per patologia	TRAP	Dimensioni lesione	Aspetto TC
Silicosi	negativo	15 mm	Formazioni multiple nodulari con diametro massimo di 1 cm. Adenopatia mediastinica paratracheale di 4 cm di aspetto necrotico colliquativo.
Aspergillosi	negativo	25 mm	Lesione a profilo irregolare con multiple escavazioni e parete ispessita.
Ascesso	negativo	40 mm	Formazione scavata con pareti ispessite. No adenopatia.
Fibrosi interstiziale	negativo	Micronodularità diffusa	Quadro micronodulare diffuso su tutto l'ambito polmonare.

Tabella 9.a. Riassunto dei casi diagnosticati come **non neoplastici** e risultati **telomerasi-negativi**. La misura dell'attività telomerasica nei BAL di questi soggetti ha ben correlato con la diagnosi clinica, poiché è risultata negativa.

Casi per patologia	TRAP	Dimensioni lesione	Aspetto TC
Sarcoidosi	+/-	36 mm	1 nodo 36 mm a dx 1 nodo 40 mm a sx
Silico-Tubercolosi	+/-	50 mm	Lesione solida a margini sfumati, disomogenea. Tumefazioni linfonodali mediastiniche con calcificazioni.

Tabella 9.b. Riassunto dei casi diagnosticati come **non neoplastici** e risultati **telomerasi scarsamente positivi**.

Queste 2 patologie (sarcoidosi e silico-tubercolosi, quest'ultima diagnosticata grazie a dati radiologici, anamnestici e di esposizione professionale, clinici e microbiologici) presentano un quadro infiammatorio

e granulomatoso correlabile con un'importante presenza di cellule linfocitarie ed essendo noto dalla letteratura (*Liu et al., 1999*) che i linfociti attivati esprimono livelli significativi di telomerasi, comunque nettamente inferiori alle cellule neoplastiche, sarebbe giustificata la blanda positività misurata in questi 2 pazienti. In realtà, questi dati sottolineano uno dei limiti delle metodiche utilizzate: l'impossibilità di indicare chiaramente se si è in presenza di situazioni infiammatorie complesse o di neoplasia. Il dosaggio dell'enzima telomerasi effettuato in questo tipo di campioni biologici, se vicino alla soglia di sensibilità, non permette di ottenere risultati conclusivi, ma deve essere interpretato alla luce di indagini diagnostiche di approfondimento. Si rende necessario quindi, per la continuazione di questo studio, includere anche un'analisi citologica del BAL, da effettuarsi tramite una metodica che prevede una separazione cellulare per mezzo di marcatori fluorescenti specifici (FACS). Ciò consentirà di identificare i tipi cellulari presenti nel campione e di fornire indicazioni sul loro numero relativo.

Casi per patologia	TRAP	Dimensioni lesione	Aspetto TC
Lesione da monitorizzare con follow-up	+/-	25 mm	Lesione solida, margini irregolari. No linfadenopatia.
Lesione da monitorizzare con follow-up	+/-	30 mm	Nodulo iperdenso a margini regolari. No linfadenopatia mediastinica.
Lesione non diagnosticata	+/-	50 mm	Infiltrazione parete toracica apicale che dà sindrome di Pancoast (tumore dell'apice polmonare che causa dolore, sindrome di Horner, osteolisi ed atrofia dei muscoli della mano)
Lesione da monitorizzare con follow-up	+	11 mm	Formazione espansiva nodulare ben circoscritta senza calcificazioni. Campi polmonari liberi.

Tabella 9.c. Riassunto dei casi in cui non vi era diagnosi definitiva e risultati **telomerasi scarsamente positivi su BAL**. Questi casi apparivano **clinicamente sospetti per** la presenza di **neoplasia polmonare primitiva**. L'iter diagnostico compiuto non ha dato indicazione chiara circa la presenza di una neoplasia polmonare. Questo dato è in contrasto apparente con la blanda positività (+/-) evidenziata dal dosaggio dell'attività enzimatica sul BAL. Inoltre in un paziente si era osservata una sicura positività. Questi pazienti sono stati necessariamente seguiti con visite cliniche di "follow-up", accompagnate da indagini radiologiche di controllo.

Riferendosi ai dati della **tabella 9.c.**, per quanto riguarda la **lesione di 25 mm** essa è stata interpretata come una possibile localizzazione polmonare di un embolo settico di origine renale. Nel paziente che mostrava una **lesione di 30 mm** non si era avuta alcuna indicazione all'intervento chirurgico, poiché la broncoscopia non aveva permesso di ottenere diagnosi certa sulla presenza neoplastica e la PET era

risultata negativa. In questo caso, il dosaggio nel BAL della telomerasi non ha permesso di contribuire significativamente alla diagnosi. Il quadro toracico TC del paziente in questo periodo non si è modificato, rispecchiando una tendenza non evolutiva della lesione che sembra correlare con la bassa positività telomerastica misurata, probabilmente da attribuirsi anche in questo caso a fenomeni di tipo infiammatorio. Un caso importante per la corretta descrizione delle potenzialità diagnostiche della telomerasi è quello della **neoformazione polmonare di 50 mm** in sede apicale destra. Il quadro generale suggeriva la presenza di una neoplasia polmonare ma in sede broncoscopica non si era avuta conferma citologica ed anche l'analisi telomerastica del BAL non aveva contribuito alla conferma di un quadro neoplastico. La localizzazione apicale della lesione potrebbe spiegare perché l'analisi broncoscopica e telomerastica siano risultate entrambe negative: limiti anatomici, dovuti alla ramificazione bronchiale, e limiti strumentali, quali flessibilità e diametro della sonda broncoscopica, rendendo difficoltosa la corretta esecuzione della broncoscopia (soprattutto nella fase di recupero), condizionano il prelievo di materiale significativo e quindi anche la diagnosi. Per quanto riguarda il paziente con la **lesione di 11 mm**, il BAL aveva evidenziato sicura positività telomerastica e l'aspetto TC descritto non escludeva la possibilità neoplastica, quindi si è disposto per la rivalutazione periodica del soggetto con monitoraggio strumentale della lesione. Questo caso è interessante poiché il "follow-up" potrebbe contribuire decisamente alla definizione della efficacia del dosaggio telomerastico. Infatti, l'analisi strumentale dovrebbe dare, nel tempo, indicazioni alla terapia, mentre a causa della ridotta dimensione e della sicura positività telomerastica, le indicazioni alla chirurgia attualmente potrebbero risultare già chiare.

Istotipo neoplasia	Dimensioni lesione	TRAP	Stadio di malattia
Carcinoma Spinocellulare	17 mm	+	la
Adenocarcinoma	18 mm	+	la
Carcinoma a Grandi cellule	23 mm	+ / -	la
Tumore Carcinoide	15 mm	negativo	la
Adenocarcinoma	33 mm	+	lb
Carcinoma Spinocellulare	80 x 70 x 70 mm	negativo	lb

Tabella 10. Istotipi tumorali descritti per dimensioni, attività telomerastica e stadiazione **TNM Ia e Ib (chiara diagnosi di neoplasia polmonare primitiva).**

La **Tabella 10** evidenzia alcuni aspetti importanti: per i campioni a bassa stadiazione di malattia (1a) esisteva una buona correlazione tra il referto anatomo-patologico ottenuto dalle metodiche tradizionali e l'analisi dell'attività telomerasica su campioni di lavaggio broncoalveolare (3/4). Questi dati sono stati anche confermati dall'analisi immunocistochimica dei casi di carcinoma spinocellulare e carcinoma a grandi cellule (**Figura 4**).

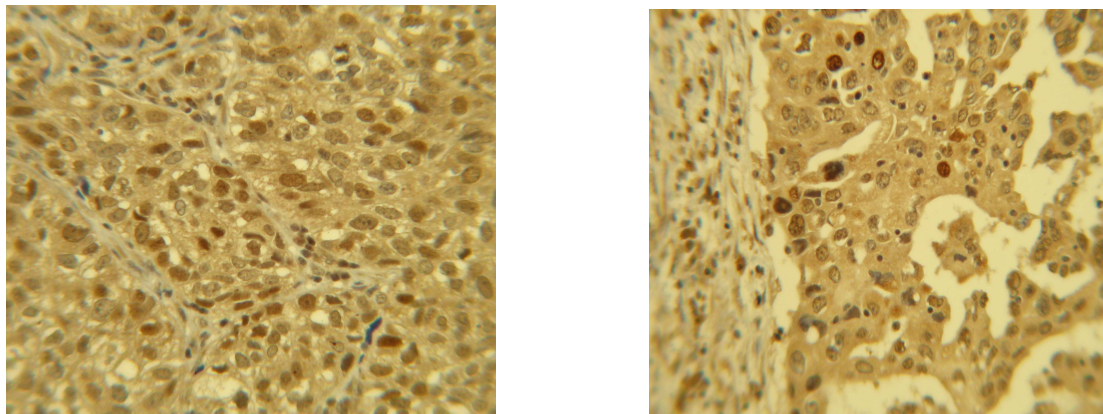


Figura 4. Immunocistochimica di un caso di **Ca spinocellulare (sinistra)** ed uno di **Ca a grandi cellule la (destra)**. Si noti che l'anticorpo anti-hTERT (porzione proteica attiva della telomerasi) riconosce specificamente la presenza dell'enzima all'interno del nucleo. La netta positività nucleare nei due preparati fornisce un'idea quantitativa delle cellule che sono telomerasi-positivo e qualitativa per l'intensità di marcatura. Come si può osservare, **il dosaggio telomerasico permetteva di individuare positività TRAP indipendentemente dalla dimensione della neoplasia.**

Un caso negativo in **Tabella 10** per l'attività telomerasica era un tumore di tipo carcinomatoide. Questa neoplasia, di piccole dimensioni, sporgente nel lume bronchiale e rivestita da mucosa all'apparenza integra, è stata sicuramente raggiunta endoscopicamente. La negatività TRAP riscontrata sul BAL di questo paziente, anche se non concorda con la stadiazione clinica, in realtà concorda con i numerosi dati della letteratura che documentano l'assenza di attività telomerasica in tumori di tipo carcinomatoide: queste neoplasie sono considerate, nella loro forma tipica, di tipo non maligno, e ciò giustifica l'assenza di attività telomerasica (*Yashima et al., 1997; Miura et al., 2001; Zaffaroni et al., 2003; Iniesta et al., 2004*). Inoltre l'analisi immunocistochimica di questo campione, prelevato dopo la chirurgia, ha rivelato una completa negatività nucleare per la telomerasi confermando così i dati derivati dal test TRAP (**Figura 5**).

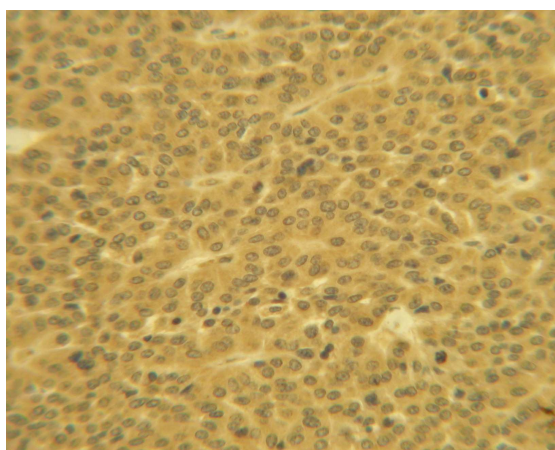


Figura 5. Immunoistochimica del caso di **tumore carcinoid**. Si noti l'**assenza di positività** nucleare per la **telomerasi**.

Per quanto riguarda i due pazienti allo stadio **lb**, riportati in **Tabella 10**, solo uno si è rivelato positivo per la telomerasi, l'adenocarcinoma, mentre la neoplasia spinocellulare appariva negativa nei dosaggi TRAP. L'immunoistochimica per l'hTERT ha confermato la positività dell'adenocarcinoma, mentre ha evidenziato per lo spinocellulare la presenza di cellule molto positive per la telomerasi (**Tabella 11, Figura 6**).

Per interpretare correttamente il reale valore delle osservazioni sperimentali relative al significato diagnostico della telomerasi per questi due pazienti sarà necessario attendere il "follow-up".

Istotipo neoplasia	Diametro Istologico	pTNM	Stadio	TRAP(BAL)	Immunoistochimica
Spinocellulare	17 mm	pT1N0M0	la	+	12 % (+)
Adenocarcinoma	18 mm	pT1N0M0	la	+	8% (+ / -)
Grandi Cellule	23 mm	pT1N0M0	la	+ / -	7% (+)
Carcinoide	15 mm	pT1N0M0	la	Negativo	Negativo
Adenocarcinoma	33 mm	pT2N0M0	lb	+	2.3% (+ / -)

Microcitoma (SCLC) - Centrale	50 mm	+	IIIb
--------------------------------------	-------	---	------

Tabella 12. La tabella riassume tutti i casi esaminati di patologie di **stadiazione II e III**. La nostra casistica non includeva casi di stadiazione IIa. Il numero dei pazienti esaminato per gli stadi IIb (2 casi), IIIa (1 caso) e IIIb (5 casi), non era tale da permettere di arrivare a delle conclusioni definitive.

La valutazione del BAL con TRAP non ha dimostrato alcuna positività telomerasica nei casi agli stadi II e III. Inoltre, la casistica riferita alle neoplasie centrale, pur se poco numerosa, sembra suggerire che tale dosaggio sul BAL sia in grado di rivelare solo una patologia come il microcitoma (SCLC). **La negatività TRAP sembrerebbe legata soprattutto alla presenza di un istotipo tumorale di tipo spinocellulare sia nelle stadiazioni II che III.** Questo dato sembra essere in contrasto con i dati ottenuti dai pazienti con lo stesso tipo di neoplasia spinocellulare con stadiazione IA, dove era stata dimostrata una netta presenza di cellule tumorali telomerasi-positive nel BAL (vd. **Tabelle 10 e 11**). La spiegazione più plausibile sarebbe da ricercarsi nelle caratteristiche di “neoplasia solida” dell’istotipo spinocellulare. Infatti, la progressione di questa neoplasia porta alla graduale esposizione sulla sua superficie di cellule desquamanti e necrotiche telomerasi –negative e non di cellule tumorali, che verrebbero raccolte prevalentemente con il lavaggio BAL. Questa ipotesi trova supporto nel fatto che il BAL effettuato su lesioni centrali risulta anch’esso telomerasi-negativo. Inoltre, una possibile conferma viene dall’analisi immunohistochimica del caso di spinocellulare a stadio IIb incluso nello studio, dove si può osservare la presenza di cellule telomerasi-positive, circondate da importanti porzioni necrotiche periferiche (**Figura 7**).

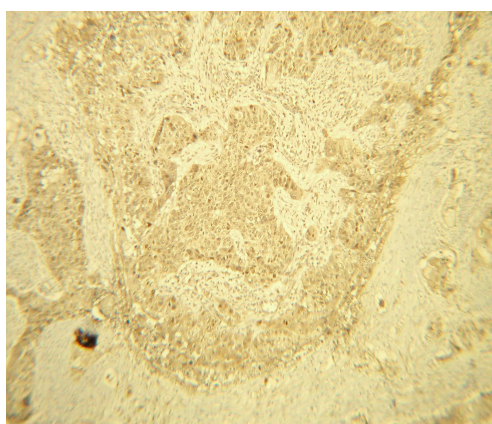


Figura 7. Analisi immunohistochimica di un caso di **neoplasia spinocellulare, stadio IIb**. Si notino le cellule telomerasi positive nella porzione centrale della neoplasia e le diffuse aree necrotiche periferiche. Il materiale contenuto nel BAL era risultato telomerasi- negativo.

Sembra quindi esserci un’apparente correlazione inversa tra attività telomerasica su BAL e la stadiazione della neoformazione maligna. La modalità con cui si effettua il lavaggio BAL è comunque sempre

determinante. Ad una paziente con diagnosi di adenocarcinoma, ad esempio, è stato effettuato un BAL in un'area polmonare differente dalla sede primaria della neoplasia, poiché qui era comparso un addensamento a margini sfumati. La prima ipotesi clinica era stata la possibile ripresa di malattia in questa sede. In questa porzione di polmone indagato con BAL non si è misurata alcuna attività telomerasica. Le indagini successive con materiale citologico hanno diagnosticato la presenza di un esito specifico (fibrosi) sul tessuto polmonare causato dal trattamento RT, praticato precedentemente al paziente. L'esame citologico ha quindi escluso la presenza di cellule neoplastiche in questa sede, come del resto suggerito dall'analisi della telomerasi sul BAL.

Istotipo neoplasia	Dimensioni lesione	TRAP	Stadio di malattia
Adenocarcinoma	30 mm	+ / -	IV
Adenocarcinoma	50 mm	Negativo	IV
Adenocarcinoma	50x70 mm	+	IV
Adenocarcinoma	60 mm	+ / -	IV
Ca spinocellulare	35 mm	Negativo	IV
Ca Spinocellulare	30 mm	++	IV
Ca a Grandi cellule	50x70 mm	Negativo	IV
Ca a Grandi cellule	130x140 mm	+ / -	IV
Ca a Grandi Cellule	40 mm	+	IV
Ca a Grandi cellule	30 mm	++	IV
Ca Bronchiolo-alveolare	35 mm	++	IV

Tabella 13. Tabella riassuntiva degli **istotipi di stadio IV** inclusi nello studio con **trattamento e "follow-up" noti**.

Istotipo neoplasia	Dimensioni lesione	TRAP	Stadio di malattia
Adenocarcinoma	20 mm	+ \ -	IV
Ca Bronchiolo-alveolare	42x38 mm	++	IV
Ca spinocellulare centrale	60 mm	++	IV

Tabella 14. Differenti istotipi di **stadio IV** di cui **non era nota l'evoluzione della malattia né il trattamento**. Correlazione con l'attività telomerasica nei BAL.

I dati complessivi per la **telomerasi nei BAL** dei casi allo **stadio IV**, riportati in **tabella 13 e 14**, in assoluto i più numerosi del nostro studio, indicano 11 casi su 14 (79%) con attività telomerastica misurabile e tra questi 5 ad alta positività, 2 a media positività, e 4 a scarsa positività. Questa metodica sembra quindi avere un **significato diagnostico importante per tutte le differenti neoplasie allo stadio IV**.

Inoltre è da notare l'alta positività delle neoplasie bronchiolo-alveolari (2 casi). I carcinomi bronchiolo-alveolari sono neoformazioni polmonari maligne solitamente non facilmente diagnosticabili e di non semplice diagnosi differenziale. La patologia, infatti, è caratterizzata, a livello radiologico, da un'estensione lobare senza netta delimitazione e simile ad un addensamento flogistico broncopolmonare. La diagnosi per questo tipo di patologia deriva essenzialmente dallo studio dell'ambiente alveolare attraverso il BAL e da prelievi biotici ottenibili per via endoscopica. Partendo dai presupposti anatomico-patologici, per cui il carcinoma bronchiolo-alveolare origina da cellule di rivestimento della cavità alveolare disposte in singolo strato a rivestire la parete, è verosimile ipotizzare che tali cellule, esposte e più facilmente staccabili dalla parete stessa, possano venire più facilmente raccolte nel liquido di lavaggio bronco-alveolare. Questo può spiegare l'elevata attività telomerastica riscontrata, più che una differente attività intrinseca di questo enzima in questa patologia. Il BAL e l'analisi della telomerasi eseguiti in caso di sospetto **carcinoma bronchiolo-alveolare** potrebbe verosimilmente avere un significato **altamente predittivo** per la diagnosi di questa patologia.

Tra le neoplasie in stadio avanzato sono da sottolineare 3 casi di negatività al TRAP, dato in contrasto con la stadiazione IV e giustificabile come determinazione di falsi negativi che limitano l'accuratezza della diagnosi con questa metodica. Poiché le neoplasie a questa stadiazione non vengono operate, non sono disponibili reperti istologici per l'analisi immunoistochimica che possano aiutare a comprendere il profilo telomerastico di queste neoplasie. E' da sottolineare la presenza di un caso con istotipo **spinocellulare stadio IV, centrale**, di dimensioni elevate (60 mm) (vd. **Tabella 14**) che possiede alta positività telomerastica (++), suggerendo l'ipotesi che la neoplasia spinocellulare possa venire più facilmente diagnosticata per mezzo del dosaggio della **telomerasi con il BAL solo nelle fasi iniziali di sviluppo (stadio I) e nelle fasi molto avanzate della patologia (stadio IV)**, piuttosto che nelle sue fasi evolutive intermedie (stadio II e III). I dati riportati nella seguente **Tabella 15** permettono di evidenziare come non esista una correlazione tra l'estensione anatomica, classificata con il parametro T, del tumore primitivo e l'attività telomerastica. Il valore diagnostico, invece, sembra apparire se si considera la dimensione obiettiva della neoplasia, misurata attraverso TC.

Istotipo neoplasia	Dimensioni	TRAP	T
NSCLC	25 mm	negativo	T1
Adenocarcinoma	30 mm	+ / -	T4
NSCLC	30 mm	+ / -	T4
NSCLC	20 mm	negativo	T1
NSCLC	20x15 mm	negativo	T2
NSCLC	50 mm	negativo	T4
Spinocellulare	35 mm	+ / -	T2
Spinocellulare	30 mm	+ / -	T2
Spinocellulare	40 mm	+ / -	T3
Spinocellulare	58x54 mm	+ / -	T4
Spinocellulare	60x10 mm	++	T2

Tabella 15. Tabella riassuntiva dei pazienti con diagnosi di **neoplasia polmonare**. Non erano noti la **stadiazione, la terapia eseguita ed il “follow-up”**. T= estensione del tumore primitivo.

Tre casi di recidiva sono stati riportati nella seguente **Tabella 16**, perché negli intenti dello studio vi era anche quello di verificare se il dosaggio telomeratico fosse utile non solo a fini diagnostici per le neoplasie primarie, ma anche per effettuare un “follow-up” non strumentale del paziente. Anche in questo caso, sebbene la casistica fosse molto limitata, la valutazione della telomerasi nel BAL pareva fornire informazioni utili per seguire l’evoluzione nel tempo di particolari neoplasie, soprattutto se si considera la non eccessiva invasività del prelievo e l’economicità del dosaggio.

Sede neoplasia	Dimensioni	Recidiva di Adenocarcinoma. Anno dell’intervento	TRAP
periferica	20 mm	1991 (M1)	+ \ -
periferica	30 mm	2001(M1)	-
periferica	60 mm	1998 (M1)	+ \ -

Tabella 16. Tre casi di **recidiva di adenocarcinoma polmonare** in cui il tumore primitivo era stato asportato precedentemente con intervento chirurgico.

Inclusi nello studio vi sono alcuni pazienti, che in base alla stadiazione di malattia avevano avuto indicazione al trattamento farmacologico (**Tabella 17**) e alla radioterapia. Lo schema di trattamento ha

finalità palliativa o di sottostadiazione della neoplasia. La **tabella 17**, di seguito riportata, permette di definire il reale potenziale dell'attività telomerasica nell'analisi delle neoplasie polmonari. Infatti, la correlazione proposta in questo schema tiene conto da un lato dell'istotipo tumorale e della sua stadiazione, dall'altro della risposta obiettiva a breve e medio termine alla terapia. Questo ci consente di ricavare una serie di importanti informazioni. Anzitutto, si osserva che **tutte le neoplasie di stadiazione inferiore alla IV non esprimevano positività significativa per la telomerasi**. L'evoluzione di queste patologie, indipendentemente dall'istotipo e dalla terapia farmacologica, risultava sostanzialmente favorevole. Infatti, tutti questi pazienti hanno avuto una risposta obiettiva, con stazionarietà della malattia (4/6, 67%), una remissione completa da 10 mesi e, per uno solo dei pazienti, dopo una risposta iniziale, una progressione mediastinica. Solo i pazienti telomerasi-positivi (* in **tabella 17**) presentavano una progressione della malattia.

Istotipo neoplasia	Stadio	TRAP	Chemioterapia	Evoluzione
Spinocellulare	IIb	negativo	Oxaliplatino (65 mg/m ²) 100 mg Vinorelbina (25 mg/m ²) entrambi gg 1-8 ogni 21 gg	Completati 5 cicli di CT. Malattia stazionaria ad oggi.
NSCLC	IIIa	negativo	Cisplatino(80 mg/m ²) gg 1ogni 21 gg Etoposide (VP 16)(120 mg/m ²) 180mg gg 1-3, ogni 21 gg	Completati 6 cicli di CT con risposta parziale (buona) sul mediastino. A 3 mesi dalla fine della CT e a 10 dalla diagnosi, paziente con stazionarietà di malattia.
Adenocarcinoma	IIIb	negativo	Carboplatino (400 mg) gg 1ogni 21 gg Vinorelbina (36.5 mg) gg 1-8 ogni 21 gg	Risposta parziale alla CT. Malattia stazionaria ad oggi.
Spinocellulare C	IIIb	negativo	1° linea: Cisplatino (80 mg/m ²) gg 1ogni 21 gg Gemcitabina(1200 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21 gg Inizia 2° linea per PD: Taxotere (75 mg/m ²) gg 1ogni 21 gg Carboplatino(400 mg) gg 1 ogni 21 gg 3° linea: Vinorelbina (36.5 mg) gg 1-8 ogni 21 gg	Completati 6 cicli con paziente in risposta alla CT. Progressione mediastinica di malattia a 8 mesi dalla fine del trattamento.
Spinocellulare	IIIb	negativo	Oxaliplatino (65 mg/m ²) 110 mg Gemcitabina (1000 mg/m ²) 1800mg entrambi gg 1-8 ogni 21 gg	Completati 6 cicli di CT. Risposta clinica completa a 10 mesi dalla fine del trattamento.
Spinocellulare*	IIIb	+ / -	1° linea: Cisplatino (80 mg/m ²) gg1ogni 21 gg Gemcitabina(1200 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21 gg 2° linea: Taxotere (70 mg/m ²) 130 mg gg1 ogni 21 gg Temozolomide (200 mg/m ²) gg 1-5 ogni 28 gg	Completati 6 cicli di CT con risposta parziale al trattamento. Durante la seconda linea decesso per PD encefalica .

Microcitoma*	IIIb	+	Cisplatino(80 mg/m ²) gg 1ogni 21 gg Etoposide(120 mg/m ²) gg 1-2-3 ogni 21 gg	Completati 4 cicli di CT con remissione clinica completa mantenuta a 7 mesi dalla fine del trattamento poi decesso per PD encefalica .
---------------------	------	---	---	---

Tabella 17. Tabella riassuntiva degli **schemi di terapia farmacologica**. Correlazione tra istotipi tumorali, **stadio II e III**, attività telomerastica in BAL ed evoluzione clinica della malattia. CT= chemioterapia PD= progressione della malattia

Questi dati permettono di arrivare a delle prime conclusioni. Il dosaggio della telomerasi nel BAL ha, come sopra descritto, delle potenzialità diagnostiche limitate. Questi dati ben si correlano con quello che già altri autori hanno riportato (*Sen S. et al., 2001 et 2002; Dikmen et al., 2003*). In realtà appare evidente che il vero significato di questo dosaggio, almeno per questi casi, sia soprattutto di tipo prognostico. L'alto grado di correlazione tra la negatività e l'esito della terapia, che non appare dipendente dallo schema terapeutico, sembra invece essere legato alla storia naturale della neoplasia. Considerando il caso del microcitoma (* **in tabella 17**) con stadiazione IIIb e telomerasi-positivo è evidente come l'evoluzione della malattia abbia portato inizialmente ad una remissione completa del tumore primitivo e successivamente alla comparsa di metastasi encefaliche. Questo caso quindi rafforza l'ipotesi circa la significatività prognostica della telomerasi. Si può quindi supporre che **la positività telomerastica, più che alla diagnosi sembra collegata alla capacità invasiva della neoplasia stessa**. Queste ipotesi saranno comunque validate con studi a lungo termine. Elementi che sono di ulteriore sostegno possono però essere dedotti dall'analisi della **casistica di stadiazione IV (Tabella 18)**.

Istotipo neoplasia	Stadio	TRAP	Chemioterapia	Evoluzione
Ca Spinocellulare	IV	negativo	Vinorelbina (25 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21gg	Completati 4 cicli. Non c'è stata risposta alla CT ma PD con decesso a 9 mesi dalla diagnosi.
Adenocarcinoma	IV	negativo	Gemcitabina (1350 mg) Oxaliplatino (88 mg) entrambi gg 1-8 ogni 21 gg	Completati 5 cicli. Risposta parziale e malattia stazionaria.
Ca a Grandi cellule	IV	negativo	Cisplatino (80 mg/m ²) gg1ogni 21 gg Gemcitabina(1200 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21 gg	Completati 8 cicli di CT con risposta parziale alla terapia. PD dopo 3 mesi dalla fine del trattamento e decesso del paziente.
Ca a Grandi cellule	IV	+ / -	Cisplatino (80 mg/m ²) gg 1ogni 21 gg Gemcitabina(1200 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21 gg	Completati 6 cicli di CT con assenza di risposta. Progressione della malattia con decesso a 8 mesi dalla diagnosi.

Adenocarcinoma	IV	+ / -	1° linea: Cisplatino (80 mg/m ²) gg 1 ogni 21 gg Vinorelbina (25 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21 gg 2° linea: Cisplatino (80 mg/m ²) gg 1 ogni 21 gg Gemcitabina(1350 mg) gg 1-8 ogni 21 gg 3° linea: Taxotere (75 mg/m ²) gg 1 ogni 21 gg Vinorelbina per os (25 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21 gg 4° linea: Vinorelbina (25 mg/m ²) gg1-8 ogni 21 gg	Completati 6 cicli di prima linea, 6 di seconda linea e 8 di terza. Paziente in PD da marzo 2003. Attualmente in vita. Effettua monosomministrazione di vinorelbina. PD ad oggi.
Ca Spinocellulare	IV	+	Vinorelbina(25 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21 gg	Completati 3 cicli. Paziente deceduto.
Ca a Grandi cellule	IV	+	Cisplatino ((80 mg/m ²) gg 1 ogni 21 gg Gemcitabina(1200 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21 gg Vinorelbina (25 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21 gg	Completati 3 cicli di CT con progressione di malattia alla ristadiazione. Data la PD si inizia monoterapia palliativa. Decesso a 6 mesi dalla diagnosi.
Adenocarcinoma	IV	+	Vinorelbina (25 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21 gg	Completati 2 cicli di CT. PD ad oggi.
Ca Bronchiolo-alveolare	IV	++	Vinorelbina (25 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21 gg	Il paziente effettua un solo ciclo di CT per PD rapida e decesso a 1 mese dalla diagnosi.
Ca a Grandi cellule	IV	++	Gemcitabina (1000 mg/m ²) Oxaliplatino (65 mg/m ²) Entrambi gg1-8 ogni 21 gg	Il paziente effettua un solo ciclo di CT per PD rapida e decesso a 1 mese dalla diagnosi.

Tabella 18. Tabella riassuntiva degli **schemi di terapia farmacologica**. Correlazione tra istotipi tumorali **stadio IV**, attività telomerasica in BAL ed evoluzione clinica della malattia. CT= chemioterapia PD= progressione della malattia.

Nel gruppo di casi riportati in **tabella 18** (stadio IV) sono rappresentate le principali patologie neoplastiche polmonari. Da un'analisi comparativa tra i livelli di attività telomerasica nei BAL e la risposta obiettiva del paziente si evidenzia nuovamente l'esistenza di un alto grado di correlazione. Ad una negatività del dosaggio corrisponde una sopravvivenza media superiore a quella osservata nei pazienti ad alta positività. I pazienti avevano completato dai 3 agli 8 cicli di chemioterapia e si era osservata in alcuni di essi una risposta parziale. Questo tipo di patologie ad elevata stadiazione ha prognosi infausta, e la sopravvivenza media è assai ridotta. La terapia farmacologica non assume per questi pazienti un significato terapeutico.

Se si prende in considerazione la positività telomerasica, si può osservare che **tutti i pazienti in stadio IV telomerasi negativi o scarsamente positivi, indipendentemente dal tipo di patologia e dallo schema terapeutico, sopportano un numero di cicli chemioterapici superiore ed hanno un'aspettativa di vita più lunga**. Infatti, i 2 pazienti che sono risultati molto positivi per la telomerasi sono deceduti entro 1 mese dalla diagnosi, e non hanno portato a termine alcun ciclo chemioterapico a

causa di una rapida progressione di malattia. Il limitato numero di pazienti, anche in questo caso, non permette di fare ulteriori correlazioni, anche perché sono disponibili dati riferiti a pazienti positivi (+) per la telomerasi ma non in terapia presso questa struttura ma presso quella di Verbania.

CONCLUSIONI

Uno degli obiettivi primari di questo studio è stato la valutazione del reale potenziale diagnostico della telomerasi nelle patologie neoplastiche polmonari per le quali esistono ancora alcune problematiche legate sia alla corretta rilevazione diagnostica, resa più difficile dall'esistenza di numerose varietà istotipiche, che alla tipologia di trattamento da seguire. La corretta definizione di malattia e di stadiazione giocano un ruolo determinante per la sopravvivenza del paziente, poiché ne condizionano in modo significativo la terapia. Essendo la presenza di attività telomerasica correlata con la presenza di cellule sicuramente tumorali nel campione biologico, tale enzima è stato assunto come marker diagnostico specifico, scelto per valutare la possibilità di accrescere l'accuratezza diagnostica. **I dati raccolti in questo studio indicano come il potenziale diagnostico della telomerasi risulti interessante soprattutto per le neoplasie di tipo periferico ed a bassa stadiazione (I, Ia, Ib) mentre non è appropriato per la diagnosi degli stadi intermedi II e III.** Inoltre è molto sensibile a numerose variabili legate soprattutto al corretto prelievo del campione di BAL da analizzare (es. raccolta di molte cellule morte di esfoliazione nel caso di carcinomi spinocellulari). I dati ottenuti con l'analisi immunocitochimica dell'enzima contribuiscono notevolmente alla sua specificità diagnostica, ma non possono essere prodotti per patologie con stadiazione molto avanzata. La correlazione tra l'attività telomerasica e la chemioterapia ha rivelato interessanti proprietà. Risulta infatti che i pazienti telomerasi-positivi in stadio III andavano incontro frequentemente a progressione della malattia, mentre i telomerasi-negativi sopportavano meglio la chemioterapia e risultano attualmente in terapia dopo 18 mesi dalla diagnosi. I pazienti allo stadio IV presentavano una stretta correlazione tra attività telomerasica e chemioterapia. L'analisi complessa, che include dati diagnostici, terapia e "follow-up", anche se preliminari, suggerisce che la valutazione dell'attività telomerasica possa avere anche un interessante valore prognostico. Questi risultati dovranno trovare conferma con ulteriori verifiche sperimentali. Le analisi effettuate su una più ampia popolazione, integrate anche con curve significative di sopravvivenza, ci permetteranno di fornire prove sperimentali per arrivare a più definitive conclusioni.

BIBLIOGRAFIA

- **Sito Web <http://www.cancer.gov> del National Cancer Institute (NCI):** accesso online ad informazioni sul cancro e sperimentazioni cliniche. Include il PDQ®, un database di informazioni sul cancro (prevenzione, screening, diagnosi, trattamento, genetica, studi clinici) e CANCERLIT®, database di citazioni ed estratti di articoli scientifici sul cancro.
- **Informazioni su ricerca, sintomi, diagnosi e trattamento del cancro del polmone. Pubblicazione del National Cancer Institute (NIH) N.ro 99-1553.**

- Albain et al. Long-term survival after concurrent cisplatin-etoposide (PE) plus chest radiotherapy followed by surgery in bulky stages IIIA (N2) and IIIB non-small cell lung cancer (NSCLC): 6 years outcome from SWOG. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999; 18:467a N.1801.
- Albanell J, Lonardo F, Rusch V, Engelhardt M, Langenfeld J, Han W, Klimstra D, Venkatraman E, Moore MA, Dmitrovsky E. High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Nov 5;89(21):1609-15.
- Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest.* 2003 Jan;123(1 Suppl):21S-49S
- American Cancer Society. Facts and Figures 2002. Atlanta, GA, *American Cancer Society, 2002, p4.*
- Aragona M, Maisano R, Panetta S, Giudice A, Morelli M, La Torre I, La Torre F. Telomere length maintenance in aging and carcinogenesis *Int J Oncol.* 2000, 17(5):981-9
- Arai T, Yasuda Y, Takaya T, Ito Y, Hayakawa K, Toshima S, Shibuya C, Yoshimi N, Kashiki Y. Application of telomerase activity for screening of primary lung cancer in broncho-alveolar lavage fluid. *Oncol Rep.* 1998 Mar-Apr;5(2):405-8.
- Arinaga M, Shimizu S, Gotoh K, Haruki N, Takahashi T, Takahashi T, Mitsudomi T. Expression of human telomerase subunit genes in primary lung cancer and its clinical significance. *Ann Thorac Surg.* 2000 Aug;70(2):401-5; discussion 405-6.
- Au NH, Cheang M, Huntsman DG, Yorlida E, Coldman A, Elliott WM, Bebb G, Flint J, English J, Gilks CB, Grimes HL. Evaluation of immunohistochemical markers in non-small cell lung cancer by unsupervised hierarchical clustering analysis: a tissue microarray study of 284 cases and 18 markers. *J Pathol.* 2004 Sep;204(1):101-9.
- Bach PB, M.J. Kelley, R.C. Tate, D.C. Mc.Crory. Screening for lung cancer. *Chest* 2003, 123:72s-82s.
- Barnoya J, Glantz S. Association of the California tobacco control program with declines in lung cancer incidence. *Cancer Causes Control.* 2004 Sep;15(7):689-95.
- Blackburn EH. Telomerase. *Annu Rev Biochem* 1992, 61:113-29.
- Böckmann B, Grill HJ Giesing M. Molecular characterization of minimal residual cancer cells in patients with solid tumors. *Biomolecular Engineering* 17 (2001) 95-111.
- Bowman R, Clarke B, Duhig E, Larsen J, Fong K. Re: Effects of N-(4-hydroxy-phenyl)retinamide on hTERT expression in the bronchial epithelium of cigarette smokers. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Jun 19;94(12):949-50; author reply 950-1.
- Boyle P. Current situation of screening for cancer. *Ann Oncol.* 2002;13 Suppl 4:189-98.
- Buccheri G, Ferrigno D; Cuneo Lung Cancer Study Group. Second-line weekly paclitaxel in patients with inoperable non-small cell lung cancer who fail combination chemotherapy with cisplatin. *Lung Cancer.* 2004 Aug;45(2):227-36
- Buccheri G, Ferrigno D. Prognostic factors of small cell lung cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2004 Apr;18(2):445-60
- Buccheri G, Ferrigno D. Familial and personal history of cancer in bronchogenic carcinoma--frequency and clinical implications. *Acta Oncol.* 2004;43(1):65-72.
- Buccheri G, Ferrigno D. Prognostic factors. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2004 Feb;18(1):187-201.
- Buccheri G, Ferrigno D. The tissue polypeptide antigen serum test in the preoperative evaluation of non-small cell lung cancer: Diagnostic yield and comparison with conventional staging methods. *Chest* 1995;107: 471-6.
- Bunn P Jr. New investigative regimens and cytotoxic agents in thoracic cancers: gemcitabine and pemetrexed. *Oncology (Huntingt).* 2004 Jul;18(8 Suppl 5):5-11.
- Buttery RC, Rintoul RC, Sethi T. Small cell lung cancer: the importance of the extracellular matrix. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (2004) 1154-1160.

Cardenal F, Lopez-Cabrerizo MP, Anton A et al. Randomised phase III study of gemcitabine-cisplatin versus etoposide-cisplatin in the treatment of locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999, 17:12-18.

Centers of Disease Control and Prevention. Percentage of adults who were current, former, or never smokers, national health interview surveys, selected years united states, 1965-1995. *Washington DC, Department of Health and Human Services, 2000.*

Cerfolio RJ, Ojha B, Bryant AS, Raghuvver V, Mountz JM, Bartolucci AA. The accuracy of integrated PET-CT compared with dedicated pet alone for the staging of patients with nonsmall cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 2004 Sep;78(3):1017-23.

Chen JL, Blasco MA, Greider CW. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA *Cell.* 2000, 100(5):503-14.

Chen W, Xiong X, Zhou H, Zhou Q. Expression of telomerase activity, telomerase RNA component and telomerase catalytic subunit gene in lung cancer. *Chin Med J (Engl).* 2002 Feb;115(2):290-2.

Cohen V, Khuri FR. Chemoprevention of lung cancer. *Curr Opin Pulm Med.* 2004 Jul;10(4):279-83.

Crinò L, Scagliotti GV, Ricci S et al. Gemcitabine and cisplatin versus mitomycin, ifosfamide, and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: A randomised phase III study of the Italian Lung Cancer Project. *J Clin Oncol* 1999, 17:3552-3530.

Crispo A, Brennan P, Jockel KH, Schaffrath-Rosario A, Wichmann HE, Nyberg F, Simonato L, Merletti F, Forastiere F, Boffetta P, Darby S. The cumulative risk of lung cancer among current, ex- and never-smokers in European men. *Br J Cancer.* 2004 Aug 3 [Epub ahead of print]

Degiovanni D, Pesce B, Ponderano N. Asbestos in Italy. *Int J Occup Environ Health.* 2004 Apr-Jun;10(2):193-7.

De Kok JB, Zendman AJ, van de Locht LT et al. Real-time htert quantification : a promising telomerase-associated tumor marker. *Laboratory Investigation, July 1999, vol. 79, n° 7: 911-912.*

Destro A, Bianchi P, Alloisio M, et al. K-ras and p16^{INK4A} alterations in sputum of NSCLC patients and heavy asymptomatic chronic smokers. *Lung Cancer (2004) 44, 23-32.*

Dhaene K, Van Marck E, Parwaresch R, 2000 Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. *Virchows Arch* 2000, 437: 1-16.

Diederich S, D. Wormanns, W. Heindel Lung cancer screening with low-dose CT . *European Journal of Radiology* 2003, 45: 2-7.

Dikmen E, Kara M, Dikmen G, Cakmak H, Dogan P, Detection of telomerase activity in bronchial lavage as an adjunct to cytological diagnosis in lung cancer *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 2003, 23: 194-200.

Di Mari A., Bollina P., Tralongo P. "Farmaci chemioterapici nel tumore polmonare". Guida alla somministrazione e all'uso.-Pacini Editore

Dong Q, Huang J, Zhou Y, Li L, Bao G, Feng J, Sha H. Hematogenous dissemination of lung cancer cells during surgery: quantitative detection by flow cytometry and prognostic significance. *Lung Cancer.* 2002 Sep;37(3):293-301.

Ducrest AL, Amacker M, Mathieu YD, Cuthbert AP, Trott DA, Newbold RF, Nabholz M, Lingner J Regulation of telomerase activity: repression by normal chromosome 3 abolishes nuclear telomerase reverse transcriptase transcripts but does not affect c-Myc activity *Cancer Res* 2001, 61: 7594-7602.

Evans TL. Highlights from the Tenth World Conference on Lung Cancer. *Oncologist.* 2004;9(2):232-8.

Falchetti ML, Levi A, Molinari P, Verna R, D'Ambrosio E. Increased sensitivity and reproducibility of TRAP assay by avoiding direct primers interaction. *Nucleic Acids Res.* 1998 Feb 1;26(3):862-3.

Fano V, Michelozzi P, Ancona C, Capon A, Forastiere F, Perucci CA. Occupational and environmental exposures and lung cancer in an industrialised area in Italy. *Occup Environ Med.* 2004 Sep;61(9):757-63.

Fossella FV, DeVore R, Kerr RN et al. Randomised phase III trial of docetaxel versus vinorelbine or ifosfamide in patients with advanced non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-containing chemotherapy regimens. *J Clin Oncol* 2000, 18:2354-2362.

Freitag L, Litterst P, Obertrifler B, Velehorsch V, Kemmer HP, Linder A, Brightman I. [Telomerase in lung cancer. Testing the activity of the "immortality enzyme" bronchial biopsies increases the diagnostic yield in cases of suspected peripheral bronchogenic carcinomas] *Pneumologie*. 2000 Nov;54(11):480-5. Abstract.

Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD. Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax*. 2003 Oct;58(10):892-900.

Fu W, Killen M, Culmsee C, Dhar S, Pandita TK, Mattson MP. The catalytic subunit of telomerase is expressed in developing brain neurons and serves a cell survival-promoting function *J Mol Neurosci*. 2000, 14(1-2):3-15.

Fujita Y, Fujikane T, Fujiuchi S, Nishigaki Y, Yamazaki Y, Nagase A, Shimizu T, Ohsaki Y, Kikuchi K. The diagnostic and prognostic relevance of human telomerase reverse transcriptase mRNA expression detected in situ in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 2003 Sep 1;98(5):1008-13.

Fujiwara M, Okayasu I, Takemura T, Tanaka I, Masuda R, Furuhashi Y, Noji M, Oritsu M, Kato M, Oshimura M. Telomerase activity significantly correlates with chromosome alterations, cell differentiation, and proliferation in lung adenocarcinomas. *Mod Pathol*. 2000 Jul;13(7):723-9.

Gescher AJ, Sharma RA, Steward WP. Cancer chemoprevention by dietary constituents: a tale of failure and promise. *Lancet Oncol*. 2001 Jun;2(6):371-9.

Giorgetti A, Volterrani D, Mariani G. : "Clinical oncological applications of Positron Emission Tomography (PET) using fluorine-18-fluoro-2-deoxy-D-glucose" . *Radiologia Medica (Torino)* 2002 ;103(4): 293-318.

Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*. 2001 Dec;25(4):386-401.

Gomez-Roman JJ, Romero AF, Castro LS, Nieto EH, Fernandez-Luna JL, Val-Bernal JF. Telomerase activity in pulmonary neuroendocrine tumors: correlation with histologic subtype (MS-0060). *Am J Surg Pathol*. 2000 Mar;24(3):417-21.

Gonzalez-Quevedo R, Iñiesta P, Moran A, de Juan C, Sanchez-Pernaute A, Fernandez C, Torres A, Diaz-Rubio E, Balibrea JL, Benito M. Cooperative role of telomerase activity and p16 expression in the prognosis of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2002 Jan 1;20(1):254-62.

Gould MK, Maclean CC, Kuschner WG, Rydzak CE, Owens DK. Accuracy of positron emission tomography for diagnosis of pulmonary nodules and mass lesions: a meta-analysis. *JAMA*. 2001 Feb 21;285(7):914-24.

Gridelli C, Perrone F, Ianniello GP et al. Carboplatin plus vinorelbine, a new well-tolerated and active regimen for the treatment of extensive-stage small-cell lung cancer: a phase II study. *J Clin Oncol* 1998, 16:1414-1419.

Gridelli C, Rossi A, Maione P. Treatment of non-small-cell lung cancer: state of the art and development of new biologic agents. *Oncogene* (2003) 22, 6629-6638.

Gugiatti A, Grimaldi A, Rossetti C, Lucignani G, De Marchis D, Borgonovi E, Fazio F. Economic analyses on the use of positron emission tomography for the work-up of solitary pulmonary nodules and for staging patients with non-small-cell-lung-cancer in Italy. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2004 Mar;48(1):49-61.

Hara H, Yamashita K, Shinada J, Yoshimura H, Kameya T. Clinicopathologic significance of telomerase activity and hTERT mRNA expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2001 Nov;34(2):219-26.

Harrington L, McPhail T, Mar V, Zhou W, Oulton R, Bass MB, Arruda I, Rob. A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 1997 Feb 14;275(5302):973-7.

Henschke CI, Yankelevitz DF, Naidich DP, McCauley DI, McGuinness G, Libby DM, Smith JP, Pasmantier MW, Miettinen OS. CT screening for lung cancer: suspiciousness of nodules according to size on baseline scans. *Radiology*. 2004 Apr;231(1):164-8. Epub 2004 Feb 27.

Henschke CI, McCauley DI, Yankelevitz DF, Naidich DP, McGuinness G, Miettinen OS, Libby DM, Pasmantier MW, Koizumi J, Altorki NK, Smith JP. Early Lung Cancer Action Project: overall design and findings from baseline screening. *Lancet*. 1999 Jul 10;354(9173):99-105.

Hess LJ and Highsmith WE Jr. Telomerase detection in body fluids. *Clinical Chemistry* 48:1; 18-24, 2002.

Hirsch A. Control of smoking to reduce the incidence of bronchial cancer: application of Evin's law in France. *Cancer Radiother*. 1998 Sep-Oct;2(5):600-2.

Hirsch FR, Brambilla E, Gray N, Gritz E, Kelloff GJ, Linnoila RI, Pastorino U, Mulshine JL. Prevention and early detection of lung cancer-clinical aspects. *Lung Cancer*. 1997 May;17(1):163-74.

Hiyama E, Hiyama K. Telomerase as tumor marker. *Cancer Lett*. 2003 May 15;194(2):221-33.

Hiyama E, Hiyama K. Clinical utility of telomerase in cancer. *Oncogene* 2002, 21:643-649.

Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyama M, Hiyama E, Piatyszek MA and Shay JW. *Journal of immunol*, 1995, 155: 3711-3715.

Hiyama K; Hiyama E; Ishioka S; Yamakido M; Inai K; Gazdar AF; Piatyszek MA; Shay JW .Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 1995, 87(12):895-902.

Hiyama E, Hiyama K, Shay JW and Yokoyama T. *Neoplasia*, 2001, 3: 17-26.

Hou M, Xu D, Bjorkholm M, Gruber A. Real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol assay for the detection of telomerase activity. *Clin Chem*. 2001, 47(3):519-24.

Humphrey LL, Teutsch S, Johnson M. Lung cancer Screening with Sputum Cytologic Examination, Chest Radiography, and Computed Tomography: An Update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annals of Internal Medicine*, 4 May 2004, vol 140. Number 89: 740-755.

Iniesta P, Gonzalez-Quevedo R, Moran A, Garcia-Aranda C, de Juan C, Sanchez-Pernaute A, Torres A, Diaz-Rubio E, Balibrea JL, Benito M. Relationship between 3p deletions and telomerase activity in non-small-cell lung cancer: prognostic implications. *Br J Cancer*. 2004 May 17;90(10):1983-8.

Iwao T, Hiyama E, Yokoyama T, Tsuchida A, Hiyama K, Murakami Y, Shimamoto F, Shay JW, Kajiyama G. Telomerase activity for the preoperative diagnosis of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1997, 89(21):1621-3.

Jamal A., Thomas A., Murray T. and Thun M. Cancer Statistics, 2002. *Ca. Cancer J. Clin.*, 52: 23-47, 2002.

Janssen-Heijnen ML, Coebergh JW. The changing epidemiology of lung cancer in Europe. *Lung Cancer*. 2003 Sep;41(3):245-58.

Jarup L. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull*. 2003;68:167-82.

Junker K. Prognostic factors in stage I/II non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2001 Sep;33 Suppl 1:S17-24.

Junker K, Langner K, Klink F, Bosse U, Thomas M. Grading of tumor regression in non-small cell lung cancer : morphology and prognosis. *Chest*. 2001 Nov;120(5):1584-91.

Kakuo S, Asaoka K, Ide T. Human is a unique species among primates in terms of telomere length *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 263(2):308-14.

Kaye FJ. Molecular biology of lung cancer. *Lung Cancer* 34 (2001) S35-S41.

- Keith WN. In situ analysis of telomerase RNA gene expression as a marker for tumor progression. *Methods Mol Med.* 2003;75:163-76.
- Keller SM, Adak S, Wagner H et al. Prospective randomized trial of postoperative adjuvant therapy in patients with completely resected stages II and IIIA non-small-cell lung cancer. Eastern Cooperative Oncology Group. *N Engl J Med* 2000; 343:1217-1222.
- Kijima T, Maulik G, Salgia R. Molecular alterations in lung cancer. Impact on prognosis. *Methods Mol Med.* 2003;75:29-38.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994, 266(5193):2011-5.
- Kim NW. Clinical implication of telomerase in cancer. *Eur J Cancer* 1997, 33: 781-786.
- Kitamura H, Kameda Y, Ito T, Hayashi H. Atypical adenomatous hyperplasia of the lung. Implications for the pathogenesis of peripheral lung adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol.* 1999 May;111(5):610-22.
- Komiya T, Kawase I, Nitta T, Yasumitsu T, Kikui M, Fukuoka M, Nakagawa K, Hirashima T. Prognostic significance of hTERT expression in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol.* 2000 Jun;16(6):1173-7.
- Kolquist KA, Ellisen LW, Counter CM, Meyerson M, Tan LK, Weinberg RA, Haber DA, Gerald WL. Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues *Nat Genet* 1998, 19(2):182-6.
- Kris MG, Herbst R, Rischin D et al. Objective regressions in non-small cell lung cancer patients treated in phase I trials of oral ZD 1839 (Iressa), a selective tyrosine kinase inhibitor that blocks the epidermal growth factor receptor (EGFR). *Lung Cancer* 2000, 29 Suppl. 1:72.
- Kumaki F, Kawai T, Hiroi S, Shinomiya N, Ozeki Y, Ferrans VJ, Torikata C. Telomerase activity and expression of human telomerase RNA component and human telomerase reverse transcriptase in lung carcinomas. *Hum Pathol.* 2001 Feb;32(2):188-95.
- Lantuejoul S, Soria JC, Moro-Sibilot D, Morat L, Veyrenc S, Lorimier P, Brichon PY, Sabatier L, Brambilla C, Brambilla E. Differential expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in lung tumours. *Br J Cancer.* 2004 Mar 22;90(6):1222-9.
- Le Chevalier T, Brisgand D, Douillard JY, Pujol JL, Alberola V, Monnier A et al. Randomised study of vinorelbine and cisplatin versus vindesine and cisplatin versus vinorelbine alone in advanced non-small-cell lung cancer: results of a European multicenter trial including 612 patients. *J Clin Oncol* 1994, 12:360-367.
- Lee JC, Jong HS, Yoo CG, Han SK, Shim YS, Kim YW. Telomerase activity in lung cancer cell lines and tissues. *Lung Cancer.* 1998 Aug;21(2):99-103.
- Liu JP. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity *FASEB J* 1999, 13(15):2091-104.
- Liu K, Schoonmaker MM, Levine BL, June CH, Hodes RJ, Weng NP. Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Apr 27;96(9):5147-52.
- Lo Russo P, Wozniak A, Foster B et al. Phase I trial of extended daily dosing of acetyldinaline (CI-994). *Ann Oncology* 1996, 7 Suppl. 1:343.
- Lu C, Komaki R, Lee JS, Shin DM, Palmer JL, Coldman BJ, Pisters KM, Kurie JM, Fossella FV, Glisson BS. A phase I study of topotecan/paclitaxel alternating with etoposide/cisplatin and thoracic irradiation in patients with limited small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2003 Jun;9(6):2085-91.
- Ma G, Gao JS, Tong M, Xiong JG, He YS, Rong TH. [Detection of telomerase hTERT gene expression of exfoliated cell in broncho-alveolar lavage fluid] *Ai Zheng.* 2002 May;21(5):533-5. Abstract.
- Marchetti A, Pellegrini C, Buttitta F, Falleni M, Romagnoli S, Felicioni L, Barassi F, Salvatore S, Chella A, Angeletti CA, Roncalli M, Coggi G, Bosari S. Prediction of survival in stage I lung carcinoma patients by telomerase function evaluation. *Lab*

Invest. 2002 Jun;82(6):729-36.

Marchetti A, Bertacca G, Buttitta F, Chella A, Quattrocchio G, Angeletti CA, Bevilacqua G. Telomerase activity as a prognostic indicator in stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res. 1999 Aug;5(8):2077-81.*

Massion PP, Carbone DP. From clinical and pathologic to molecular staging of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med. 2003 Jun 15;167(12):1587-8.*

Masutimi K, Hahn C. Telomerase and tumorigenesis *Cancer Letters 2003, 194:163-172.*

Meeker AK, Coffey DS. Telomerase: a promising marker of biological immortality of germ, stem, and cancer cells. *A review. Biochemistry (Mosc). 1997 Nov;62(11):1323-31.*

Meert anne-Pascale, Martin B, Verdebout JM et al. Correlation of different markers (p53, EGF-R, c-erbB-2, Ki-67) expression in the diagnostic biopsies and the corresponding resected tumors in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer (2004) 44, 295-301.*

Mergny JL, Riou JF, Mailliet P, Teulade-Fichou MP, Gilson E. Natural and Pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acids Research, 2002, 30(4):839-865.*

Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L, Beijersbergen RL, Dovidoff MJ, Liu QY, Bacchetti S, Haber DA and Weinberg RA. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization *Cell 1997, 90:785-795.*

Micke P, Faldum A, Metz T, Beeh KM, Bittinger F, Hengstler JG, Buhl R. Staging small cell lung cancer: Veterans Administration Lung Study Group versus International Association for the Study of Lung Cancer--what limits limited disease? *Lung Cancer. 2002 Sep;37(3):271-6.*

Miura N, Onuki N, Rathi A, Virmani A, Nakamoto S, Kishimoto Y, Murawaki Y, Kawasaki H, Hasegawa J, Oshimura M, Travis WD, Gazdar AF. hTR repressor-related gene on human chromosome 10p15.1. *Br J Cancer. 2001 Nov 16;85(10):1510-4.*

Mollo F, Magnani C, Bo P, Burlo P, Cravello M. The attribution of lung cancers to asbestos exposure: a pathologic study of 924 unselected cases. *Am J Clin Pathol. 2002 Jan;117(1):90-5.*

Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell 1989, 59: 521-529.*

Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest. 1997 Jun;111(6):1710-7.*

Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 85: 6622-6626.*

Nakanishi K, Kawai T, Kumaki F, Hirotsu S, Mukai M, Ikeda E, Koering CE, Gilson E. Expression of mRNAs for telomeric repeat binding factor (TRF)-1 and TRF2 in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. *Clin Cancer Res. 2003 Mar;9(3):1105-11.*

Nakanishi K, Kawai T, Kumaki F, Hirotsu S, Mukai M, Ikeda E. Expression of Human telomerase RNA Component and Telomerase Reverse Transcriptase mRNA in Atypical Adenomatous Hyperplasia of the lung. *Human Pathology, vol.33, n° 7 (July 2002).*

Nguyen LN, Komaki R, Allen P, Schea RA, Milas L. Effectiveness of accelerated radiotherapy for patients with inoperable non-small cell lung cancer (NSCLC) and borderline prognostic factors without distant metastasis: a retrospective review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1999 Jul 15;44(5):1053-6.*

Non Small Cell Lung Cancer Collaborative Group. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. *BMJ 1995; 311:899-909.*

Nordquist LT, Simon GR, Cantor A, Alberts WM, Bepler G. Improved survival in never-smokers vs current smokers with primary adenocarcinoma of the lung. *Chest. 2004 Aug;126(2):347-51.*

Nosenzo M., Tassi G. “Percorsi Diagnostico-Terapeutici in Pneumologia”- EdiAipo2000

Nugent CI, Lundblad V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev* 1998, 12(8):1073-85.

Nyberg F, Agudo A, Boffetta P, Fortes C, Gonzalez CA, Pershagen G. A European validation study of smoking and environmental tobacco smoke exposure in nonsmoking lung cancer cases and controls. *Cancer Causes Control*. 1998, 9(2):173-82.

O'Brien Metal. Taxol and Carboplatin induction chemotherapy in stage IIIA Non-Small Cell Lung Cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999; 18:492a N.1898.

Osaki T, Nagashima A, Yoshimatsu T, Tashima Y, Yasumoto K. Survival and characteristics of lymph node involvement in patients with N1 non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2004 Feb;43(2):151-7.

Osaki T, Oyama T, Inoue M, Gu CD, Kodate M, Aikawa M, So T, Mizukami M, Mitsudomi T, Yasumoto K. Molecular biological markers and micrometastasis in resected non-small-cell lung cancer. Prognostic implications. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001 Sep;49(9):545-51.

Papi A, Casoni G, Caramori G, Guzzinati I, Boschetto P, Ravenna F, Calia N, Petruzzelli S, Corbetta L, Cavalleco G, Forini E, Saetta M, Ciaccia A, Fabbri LM. COPD increases the risk of squamous histological subtype in smokers who develop non-small cell lung carcinoma. *Thorax*. 2004 Aug;59(8):679-81.

Pasini F, Durante E, De Manzoni D, Rosti G, Pelosi G. High-dose chemotherapy in small-cell lung cancer. *Anticancer Res*. 2002 Nov-Dec;22(6B):3465-72.

Pasini F, Verlatto G, Durante E, de Manzoni G, Valduga F, Accordini S, Pedrazzani C, Terzi A, Pelosi G. Persistent excess mortality from lung cancer in patients with stage I non-small-cell lung cancer, disease-free after 5 years. *Br J Cancer*. 2003 Jun 2;88(11):1666-8.

Pasini F, Pelosi G, Valduga F, Durante E, de Manzoni G, Zaninelli M, Terzi A. Late events and clinical prognostic factors in stage I non small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2002 Aug;37(2):171-7.

Pastorino U. Molecular targeting: the New Challenge in Lung Cancer Prevention Editorial. *Journal of the National Cancer Institute*, vol.93, No16, August 15, 2001.

Pastorino U, M. Bellomi, C. Landoni et al. : “Early lung cancer detection with spiral CT and positron emission tomography in heavy smokers: 2 years results”. *Lancet* 2003; 362: 593-97.

Patz EF, S. Rossi, D.H. Harpole Correlation of tumor size and survival in patients with stage Ia non small lung cancer. *Chest* 2000, 117: 1568-71.

Perez-Soler R, Chachoua A, Huberman M et al. A phase II trial of the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine Kinase inhibitor OSI-774 following platinum-based chemotherapy, in patients (pts) with advanced, EGFR-expressing, non-small cell lung cancer (NSCLC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001.

Piatyszek mA, Kim NW, Weinrich SL, Hiyama E, Wrigth WE and Shay JK. *Method Cell Sci*, 1995, 17: 1-5.

Pisa FE, Barbone F, Betta A, Bonomi M, Alessandrini B, Bovenzi M. Residential radon and risk of lung cancer in an Italian alpine area. *Arch Environ Health*. 2001 May-Jun;56(3):208-15.

Port JL, Kent M, Altorki NK. Early lung cancer detection and treatment strategies. *Surg Oncol*. 2002 Dec;11(4):191-9.

Port JL, Kent MS, Korst RJ, Libby D, Pasmantier M, Altorki NK. Tumor size predicts survival within stage IA non-small cell lung cancer. *Chest*. 2003 Nov;124(5):1828-33.

Postmus PE, Green MR. Overview of MTA in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Semin Oncol* 1999, 1 (suppl. 4):31-36.

Raghu G, Nyberg F, Morgan G. The epidemiology of interstitial lung disease and its association with lung cancer. *Br J Cancer*. 2004 Aug;91 Suppl 2:S3-S10.

- Rhyu MS. Telomeres, telomerase, and immortality. *J Natl Cancer Inst.* 1995 Jun 21;87(12):884-94.
- Richiardi L, Boffetta P, Simonato L, Forastiere F, Zambon P, Fortes C, Gaborieau V, Merletti F. Occupational risk factors for lung cancer in men and women: a population-based case-control study in Italy. *Cancer Causes Control.* 2004 Apr;15(3):285-94.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 1997 Feb 15;245(2):154-60.
- Roth BJ, Johnson DH, Einhorn LH, et al. Randomised study of cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine versus etoposide and cisplatin versus alternation of these two regimens in extensive small cell lung cancer: a phase III trial of the Southeastern Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1992, 10:282-291.
- Rubin BP, Skarin AT, Pisick E, Rizk M, Salgia R. Use of cytokeratins 7 and 20 in determining the origin of metastatic carcinoma of unknown primary, with special emphasis on lung cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2001 Feb;10(1):77-82.
- Saretzki G, Petersen S, Petersen I, Kolble K, von Zglinicki T. hTERT gene dosage correlates with telomerase activity in human lung cancer cell lines. *Cancer Lett.* 2002 Feb 8;176(1):81-91.
- Sarvesvaran J, Going JJ, Milroy R, Kaye SB, Keith WN. Is small cell lung cancer the perfect target for anti-telomerase treatment? *Carcinogenesis.* 1999 Aug;20(8):1649-51.
- Sattler M, Salgia R. Molecular and cellular biology of small cell lung cancer. *Semin Oncol.* 2003 Feb;30(1):57-71.
- Savastano L, Bonacci S, Saracino V, Longo M. The association of lung cancer with asbestos and tobacco smoking. *Clin Ter.* 2004 Feb-Mar;155(2-3):69-74.
- Scagliotti GV, De Marinis F, Rinaldi M, et al. Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2002 Nov 1;20(21):4285-91.
- Schiller J, Tilden D, Aristides M, Lees M, Kielhorn A, Maniadas N, Bhalla S. Retrospective cost analysis of gemcitabine in combination with cisplatin in non-small cell lung cancer compared to other combination therapies in Europe. *Lung Cancer.* 2004 Jan;43(1):101-12.
- Sekine Y, Fujisawa T. [Prognostic factors on surgical treatment for lung cancer] *Kyobu Geka.* 2003 Jul;56(8 Suppl):722-7. Abstract.
- Sen S, Reddy VG, Guleria R, Jain SK, Kapila K, Singh N. Telomerase--a potential molecular marker of lung and cervical cancer. *Clin Chem Lab Med.* 2002 Oct;40(10):994-1001.
- Sen, S., Reddy, V.G., Khanna, N., Guleria, R., Kapila, K. Singh. A comparative study of telomerase activity in sputum, bronchial washing and biopsy specimens of lung cancer *Lung Cancer* 2001, 33: 41-49.
- Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997, 33: 787-791.
- Shay JW, Wright WE. Telomerase activity in human cancer. *Curr. Opin Oncol* 1996; 8:66-71.
- Shepherd FA, Dancey J, Ramlau R et al. Prospective randomised trial of docetaxel versus best supportive care in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000, 18:2095-2103.
- Shibuya K, Fujisawa T, Hoshino H, Baba M, Saitoh Y, Iizasa T, Sekine Y, Suzuki M, Hiroshima K, Ohwada H. Increased telomerase activity and elevated hTERT mRNA expression during multistage carcinogenesis of squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer.* 2001 Aug 15;92(4):849-55.
- Sobin LH, Wittekind Ch eds - UICC: "TNM Classification of Malignant Tumors, 5th. ed." *John Wiley, 1997, New York.*
- Soder AI, Hoare SF, Muir S, Going JJ, Parkinson EK, Keith WN. Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer. *Oncogene.* 1997 Mar 6;14(9):1013-21.

- Soria JC, Xu X, Liu DD, Lee JJ, Kurie J, Morice RC, Khuri F, Mao L, Hong WK, Lotan R. Retinoic acid receptor beta and telomerase catalytic subunit expression in bronchial epithelium of heavy smokers. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Jan 15;95(2):165-8.
- Soria JC, Brisgand D, Le Chevalier T. Do all patients with advanced non-small-cell lung cancer benefit from cisplatin-based combination therapy? *Ann Oncol.* 2001 Dec;12(12):1667-70.
- Soria JC, Morat L, Durdux C, Housset M, Cortez A, Blaise R, Sabatier L. The molecular detection of circulating tumor cells in bladder cancer using telomerase activity. *J Urol.* 2002 Jan;167(1):352-6.
- Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Ratcliffe C, Roz E, Cirenei N, Bellomi M, Pelosi G, Pierotti MA, Pastorino U. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol.* 2003 Nov 1;21(21):3902-8. Epub 2003 Sep 24.
- Strass G., Dominioni L. International Conference on Prevention and Early Diagnosis of Lung Cancer. Varese Meeting Report. *Lung Cancer* 1999;23:171-172.
- Svobodnik A, Yang P, Novotny PJ, Bass E, Garces YI, Jett JR, Bonner JA, Sloan JA. Quality of life in 650 lung cancer survivors 6 months to 4 years after diagnosis. *Mayo Clin Proc.* 2004 Aug;79(8):1024-30.
- Szarka CE, Grana G, Engstrom PF. Chemoprevention of cancer. *Curr Probl Cancer.* 1994 Jan-Feb;18(1):6-79.
- Taga S, Osaki T, Ohgami A, Imoto H, Yasumoto K. Prognostic impact of telomerase activity in non-small cell lung cancers. *Ann Surg.* 1999 Nov;230(5):715-20.
- Taneja TK and Sharma SK. Markers of small cell lung cancer. *World Journal of Surgical Oncology* 2004, 2:10.
- Tomida S, Koshikawa K, Yatabe Y et al. Gene expression-based, individualized outcome prediction for surgically treated lung cancer patients. *Oncogene* (2004), 1-11.
- Tommerup H, Dousmanis A, de Lange T. Unusual chromatin in human telomeres. *Mol Cell Biol* 1994 Sep;14(9):5777-85.
- Toomey D, Smyth G, Condron C, Kay E, Conroy R, Foley D, Hong C, Hogan B, Toner S, McCormick P, Broe P, Kelly C, Bouchier-Hayes D. Immune function, telomerase, and angiogenesis in patients with primary, operable nonsmall cell lung carcinoma: tumor size and lymph node status remain the most important prognostic features. *Cancer.* 2001 Nov 15;92(10):2648-57.
- Travis WD., Colby TV., Corrin B et al. Histological typing of lung and pleural tumours, in World Health Organization-*International Histological Classification of Tumours, New York, NY, Springer Verlag, 1999.*
- Tyczynski JE, Bray F, Parkin DM. Lung cancer in Europe in 2000: epidemiology, prevention, and early detection. *Lancet Oncol.* 2003 Jan;4(1):45-55. Review. Erratum in: *Lancet Oncol.* 2003 Jul;4(7):396.
- Vandesompele J, De Paepe A, Speleman F. Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. *Anal Biochem.* 2002 Apr 1;303(1):95-8.
- Van Klaveren RJ, H.J. de Koning, J. Mulshine, F. R. Hirsch. Lung cancer screening by spiral CT. What is the optimal target population for screening trials? *Lung Cancer* 2002, 38:243-252
- Van Klaveren RJ, Habbema JDF, Pedersen JH, de Koning HJ, Oudkerk M, Hoogsteden HC. Lung cancer screening by low-dose spiral computed tomography. *Eur Respir J.* 2001 Nov;18(5):857-66.
- Van Zandviik et al. Phase II study of gemcitabine plus cisplatin as induction regimen for patients with stage IIIA non small cell lung cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1998; 17:468a N.1799.
- Veglia F, Vineis P, Berrino F, Cerulli Ddel S, Giurdanella MC, Tumino R, Fiorini L, Sacerdote C, Panico S, Mattiello A, Palli D, Saieva C, Davico L. Determinants of exposure to environmental tobacco smoke in 21,588 Italian non-smokers. *Tumori.* 2003 Nov-Dec;89(6):665-8.
- Viegi G, Scognamiglio A, Baldacci S, Pistelli F, Carrozzi L. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

Respiration. 2001;68(1):4-19.

Volm M, Rittgen W. Cellular predictive factors for the drug response of lung cancer. *Anticancer Res*. 2000 Sep-Oct;20(5B):3449-58.

Wallace MB, Block M, Hoffman BJ, Hawes RH, Silvestri G, Reed CE, Mitas M, Ravenel J, Fraig M, Miller S, Jones ET, Boylan A. Detection of telomerase expression in mediastinal lymph nodes of patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Jun 15;167(12):1670-5. Epub 2003 Feb 20.

Wang A, Huang L, Chen Y. [The diagnostic value of telomerase activity in bronchial biopsy specimen for lung cancer]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2000 Aug;23(8):475-7. Abstract.

Wang L, Soria JC, Kemp BL, Liu DD, Mao L, Khuri FR. hTERT expression is a prognostic factor of survival in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2002 Sep;8(9):2883-9.

Wang J, Liu X, Jiang W. [Relationship among telomerase activity, telomerase RNA and telomerase catalytic subunit gene expression and their significance in non small-cell lung cancer] *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2001 Jul;23(4):289-92. Abstract.

Wang J, Liu X, Jiang W, Liang L. Telomerase activity and expression of the telomerase catalytic subunit gene in non-small cell lung cancer: correlation with decreased apoptosis and clinical prognosis. *Chin Med J (Engl)*. 2000 Nov;113(11):985-90.

Wang X, Zhang Z, He M. [Location expression of human telomerase reverse transcriptase in lung cancer, benign lesion and normal lung tissue] *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2001 Aug;24(8):461-4. Abstract.

Wang L, Soria JC, Chang YS, Lee HY, Wei Q, Mao L. Association of a functional tandem repeats in the downstream of human telomerase gene and lung cancer. *Oncogene*. 2003 Oct 16;22(46):7123-9.

Wang L, Lin SH, Wu WG, Kemp BL, Walsh GL, Hong WK, Mao L. C-CAM1, a candidate tumor suppressor gene, is abnormally expressed in primary lung cancers. *Clin Cancer Res*. 2000 Aug;6(8):2988-93.

Wattenberg LW, Wiedmann TS, Estensen RD, Zimmerman CL, Galbraith AR, Steele VE, Kelloff GJ. Chemoprevention of pulmonary carcinogenesis by brief exposures to aerosolized budesonide or beclomethasone dipropionate and by the combination of aerosolized budesonide and dietary myo-inositol. *Carcinogenesis*. 2000 Feb;21(2):179-82.

Wege H, Chui MS, Le HT, Tran JM, Zern MA. SYBR Green real-time telomeric repeat amplification protocol for the rapid quantification of telomerase activity. *Nucleic Acids Res*. 2003 Jan 15;31(2):E3-3.

Wilhelm J, Hahn M, Pingoud A. Influence of DNA target melting behavior on real-time PCR quantification. *Clin Chem*. 2000 Nov;46(11):1738-43.

Winterhalder RC, Hirsch FR, Kotantoulas GK, Franklin WA, Bunn PA Jr. Chemoprevention of lung cancer--from biology to clinical reality. *Ann Oncol*. 2004 Feb;15(2):185-96.

Wu TC, Lin P, Hsu CP, Huang YJ, Chen CY, Chung WC, Lee H, Ko JL. Loss of telomerase activity may be a potential favorable prognostic marker in lung carcinomas. *Lung Cancer*. 2003 Aug;41(2):163-9.

Wu X, Kemp B, Amos CI, Honn SE, Zhang W, Walsh GL, Spitz MR. Associations among telomerase activity, p53 protein overexpression, and genetic instability in lung cancer. *Br J Cancer*. 1999 May;80(3-4):453-7.

Xinarianos G, Scott FM, Liloglou T, Prime W, Turnbull L, Walshaw M, Field JK. Evaluation of telomerase activity in bronchial lavage as a potential diagnostic marker for malignant lung disease. *Lung Cancer*. 2000 Apr;28(1):37-42.

Yahata N, Ohyashiki K, Kato H, Toyama K. [The advantage of an in situ TRAP assay for the detection of telomerase activity using bronchial washings obtained from lung cancer patients] *Nippon Rinsho*. 1998 May;56(5):1272-7. Abstract.

Yahata N, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Iwama H, Hayashi S, Ando K, Hirano T, Tsuchida T, Kato H, Shay JW, Toyama K. Telomerase activity in lung cancer cells obtained from bronchial washings. *J Natl Cancer Inst*. 1998 May 6;90(9):684-90.

Yan YL, Zheng JX, Wang X, Wang Y, Yang JY. [Detection of telomerase activity in bronchoscopic brush-off samples in patients with lung cancer]. *Ai Zheng*. 2002 Jul; 21(7):768-71. Abstract.

Yang P, Wentzlaff KA, Katzmann JA, Marks RS, Allen MS, Lesnick TG, Lindor NM, Myers JL, Wiegert E, Midthun DE, Thibodeau SN, Krowka MJ. Alpha1-antitrypsin deficiency allele carriers among lung cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999 May;8(5):461-5.

Yashima K, Litzky LA, Kaiser L, Rogers T, Lam S, Wistuba II, Milchgrub S, Srivastava S, Piatyszek MA, Shay JW, Gazdar AF. Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res*. 1997 Jun 15;57(12):2373-7.

Yokota J and Kohno T. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Sci*, March 2004, vol.95, n°3: 197-204.
Zaffaroni N, De Polo D, Villa R, Della Porta C, Collini P, Fabbri A, Pilotti S, Daidone MG. Differential expression of telomerase activity in neuroendocrine lung tumours: correlation with gene product immunophenotyping. *J Pathol*. 2003 Sep;201(1):127-33.

Zinner RG, Fossella FV, Herbst RS. Pemetrexed in advanced NSCLC: a review of the clinical data. *Oncology (Huntingt)*. 2004 Jul;18(8 Suppl 5):54-62.

Zinner RG, Herbst RS. Pemetrexed in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: a review of the clinical data. *Clin Lung Cancer*. 2004 Apr;5 Suppl 2:S67-74.

Zochbauer-Muller S, Minna JD. The biology of lung cancer including potential clinical applications. *Chest Surg Clin N Am*. 2000 Nov;10(4):691-708.

SEMINARI FREQUENTATI

- 07/07/2004 Prof. Martin Ronis del (Dept of Pharmacology and Toxicology, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, USA). *Ethanol metabolism and Toxicity in Pregnancy.*
- 05/07/2004 Prof. Armando Bartolazzi (Dipartimento di Patologia, Facoltà di Medicina, Ospedale St.Andrea, Università La Sapienza – Roma). *From the bench to the bedside: Galectin-3 immunodetection for improving the preoperative diagnosis of the follicular thyroid lesions.*
- 30/06/2004 Dott. Manlio FERRARINI (IST e Università di Genova). *Meccanismi patogenetici della Leucemia Linfatica Cronica.*
- 15/06/2004 Dott. David Murphy (Dipartimento di Neuroscienze e Neuroendocrinologia, Università di Bristol). *Functional genomics of hypothalamic homeostatic plasticity.*
- 14/06/2004 Dott. David Murphy (Dipartimento di Neuroscienze e Neuroendocrinologia, Università di Bristol). *Biomedical discovery using microarrays: principles, prospects and problems.*
- 14/06/2004 Prof. Christopher Day (Centre for Liver Research, Medical School, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK). *Pitfalls of genetic studies in liver disease.*
- 11/06/2004 Dott. Antonio Puccetti (Università di Genova). *Virus e malattie autoimmuni.*
- 28/05/2004 Prof. Angiolo Benedetti (Dipartimento di Fisiopatologia e Medicina Sperimentale dell'Università di Siena). *Il reticolo endoplasmatico: un labirinto metabolico.*
- 20/05/2004 Dott. Alberto Martini (Istituto Scientifico Gaslini e Università di Genova). *Le artriti croniche del bambino.*
- 05/05/2004 Prof. Bice Fubini (Dipartimento di Chimica IFM, Chimica Inorganica, Fisica e dei Materiali, Università di Torino, Facoltà di Farmacia, Direttore del Centro Interdipartimentale "G. Scansetti" per lo Studio degli Amianti e di altri Particolati Nocivi), presso la sede del Discaff dell'Università di Novara. *Come comprendere i meccanismi di patogenicità delle fibre di amianto? Necessità di un approccio multidisciplinare.*
- 03/05/2004 Dott. Frédéric Rieux-Laucat (INSERM 429, Hôpital Necker, Paris). *Genetic bases of the Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) subtypes.*
- 31/03/2004 Dott.ssa Antonia Follenzi (Albert Einstein College of Medicine, Liver Research Center 1300 Morris Park Avenue, Bronx, NY 10461 – USA). *Espressione epato-specifica del fattore IX antiemofilico mediante l'uso di vettori lentivirali.*
- 10 /03/2004 Prof. Guido Valesini (Cattedra di Reumatologia, Università la Sapienza di Roma). *TNF, anti-TNF ed autoimmunità.*
- 18/02/2004 Dott.ssa Bice Chini (CNR Istituto di Neuroscienze, Sezione di Farmacologia cellulare e molecolare, Milano). *Lipid rafts e recettore per l' ossitocina: modulazione del signalling e del controllo della proliferazione cellulare.*

- 17/02/2004 Dott.ssa Maria Gabriella Scordo (Department of Medical Sciences Clinical Pharmacology University of Uppsala, Svezia). *Citocromo P450: polimorfismi genetici e risposta clinica ai farmaci.*
- 03/02/2004 Dr.ssa Rita Clementi (Università di Pavia). *Alterazioni del gene della perforina nelle patologie linfoproliferative.*
- 30/01/2004 Prof. Magnus Ingelman-Sundberg (Division of Molecular Toxicology, Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden). *Pharmacogenetics: a tool for a more efficient and safe drug therapy.*
- 27/01/2004 Dott. Alan Kozikowski (University of Illinois, Chicago), seminario presso il DISCAFF. *Chemistry and biology of natural products-derived molecules targeted to the brain.*

CONGRESSI E CORSI

3° Convegno sulla "real time" PCR: la "real time" PCR verso nuove applicazioni (Ricerca Biomedica e Diagnostica Molecolare)- Milano, 24 Giugno 2004.

1st ISC International Conference on Cancer Therapeutics Molecular Targets, Pharmacology and Clinical Applications-Firenze, 19-21 Febbraio 2004.

09/06/2004 "Nuove tecnologie e Sviluppi nell'analisi del Proteoma" seminario organizzato presso il Palazzo LITA, Segrate, Milano da Proteomics Alliance in collaborazione con l'Università degli Studi di Milano ed il CNR.

13/05/2004 1° Seminario del Corso: Scienze della vita e casi giudiziari. Un laboratorio "Il caso Sergeant: test genetici predittivi, riservatezza e lavoro" organizzato presso il Palazzo di Giustizia di Milano dall'Università di Milano, Facoltà di Giurisprudenza in collaborazione con l'Università di Pavia, European Network for Life Sciences, Health and the Courts (ENLS). Relatore scientifico: Dott. Paolo Radice (Oncologia Sperimentale, Milano). Relatore giuridico: Dott.ssa Adele Savastano (Giudice, Lodi). Discussant: Dott. Giorgio Mannaccio (Giudice, Milano). Coordinatore: Dott. Amedeo Santuosso (Tribunale di Milano).

11/05/2004 Corso di Bioetica "Cellule staminali e clonazione" organizzato presso il Dip. di Farmacologia e Tossicologia Medica, Università di Milano. Relatori: Prof. G. Cossu (Università La Sapienza, Roma), Prof. P. Vezzosi (C.N.R., Segrate), Prof. P. Cattorini (Università dell'Insubria), Dott. C. Galli (Consorzio incremento zootecnico, Cremona), Dott.ssa M. Fiumanò (Scuola di Specializzazione per Psicoterapeuti, Milano), Dott. A. Santuosso (Tribunale di Milano). Coordinatrice scientifica: Prof. Anna Collier.

28/04/2004 Corso teorico (Dott. Marco Brambilla) "Norme operative di protezione e sicurezza per i laboratori di ricerca" organizzato dal Dipartimento di Scienze Mediche dell'Università del Piemonte Orientale di Novara in ottemperanza a quanto previsto dall'art. 61, comma 3, lett c e D.L.gs 230/95 e s.m.i.

27/04/2004 Dott.ssa S. Ceffa (Comunità di Sant'Egidio, Novara). Progetto DREAM (Drug Resource Enhancement Against AIDS in Mozambico).

24/04/2004 Incontro di Studio "Impresa, valori sociali e nuova Sanità" organizzato dalla Fondazione Policlinico di Monza e dalla Clinica San Gaudenzio di Novara. Presidente: Prof. Ilario Viano.

23/04/ 2004 Seminario "Seminario di cultura brevettale" organizzato dal Network per la valorizzazione della ricerca universitaria presso il DISCAFF, Università del Piemonte Orientale, Novara.

ABSTRACTS

Colangelo D, Ghiglia A, Vandone A, Poma F, Balbo P, Cristina S, Monga G, Alabiso O, Viano I. *"Telomerase may have a decisive prognostic role for lung cancers and help in therapeutic decision"*. Atti del 1st ISC International Conference on Cancer Therapeutics Molecular Targets, Pharmacology and Clinical Applications-Firenze, 19-21 Febbraio 2004, pag.195.

AnnaRita Ghezzi, Maurizio Aceto, Claudio Cassino, Elisabetta Gabano, Donato Colangelo, AnnaLisa Ghiglia, Homa Mahboobi, Domenico Osella. *"Cellular uptake of antitumor platinum(II)-complexes evaluated by means of ICP-MS technique"*. Atti del 3° Workshop on Pharmaco-Bio-Metallics- Sorrento, Napoli, 7-9 Novembre 2003, pagg.45-46.

PUBBLICAZIONI

Colangelo D, Ghiglia A, Viano I, Mahboobi H, Ghezzi A, Cassino C, Osella D. *Might telomerase enzyme be a possible target for trans-Pt(II) complexes?* J Inorg Biochem. 2004 Jan;98(1):61-7.

Donato Colangelo, AnnaLisa Ghiglia, AnnaRita Ghezzi, Mauro Ravera, Edward Rosemberg, Fabrizio Spada, Domenico Osella. *Water-soluble benzoheterocycle triosmium clusters as potential inhibitors of telomerase enzyme*. Accepted with minor reviews.