IL RUOLO DEI MicroRNA NEL PAPILLOMA INVERTITO NASO-SINUSALE

INDICE

ABSTRACT

CAPITOLO I: PAPILLOMA INVERTITO NASO-SINUSALE

I.1 Introduzione

I.2 Valutazione istopatologica

I.3 Eziologia e Patogenesi

I.4 Trasformazione maligna

I.5 Genetica

I.6 Imaging

I.7 Stadiazione

I.8 Terapia

I.9 Follow-up

CAPITOLO II: STUDIO SPERIMENTALE

II.1 Introduzione

II.2 Obiettivo dello studio

II.3 Materiali e metodi

II.4 Risultati

II.5 Discussione

II.6 Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

RINGRAZIAMENTI

ABSTRACT

Introduzione: il papilloma invertito naso-sinusale (SNIP) è una neoplasia epiteliale benigna che origina dalla mucosa respiratoria naso-sinusale. Anche se istologicamente benigno il papilloma invertito naso-sinusale ha un decorso clinico potenzialmente aggressivo data l'elevata incidenza di recidiva e la possibilità di trasformazione maligna in carcinoma squamocellulare naso-sinusale (SNSCC). L'eziopatogenesi del papilloma invertito naso-sinusale resta ad oggi poco conosciuta.
La ricerca attuale mira all'identificazione delle alterazioni molecolari genetiche ed epigenetiche coinvolte nello sviluppo del SNIP e nella sua trasformazione maligna in SNSCC con l'obiettivo di identificare biomarkers diagnostici e prognostici e specifici target terapeutici.

Obiettivo dello studio: valutare il ruolo ed il possibile significato clinico-prognostico dell'espressione di specifici microRNA nel papilloma invertito naso-sinusale e nel carcinoma squamocellulare naso-sinusale.

Materiali e metodi: studio di coorte retrospettivo su 32 pazienti sottoposti ad intervento chirurgico primario per SNIP e 6 pazienti sottoposti ad intervento chirurgico primario per SNSCC con analisi del miRNoma tramite tecnologia Next Generation Sequencing (NGS) sui campioni chirurgici di tessuto tumorale (SNIP e SNSCC) e tessuto sano adiacente.
Dall'analisi del miRNoma, eseguita in un sottogruppo di pazienti affetti da SNIP (n=5) e pazienti affetti da SNSCC (n=6), è stato identificato un profilo di miRNAs costituzionalmente deregolati nel SNIP e nel SNSCC e biologicamente rilevanti nel differenziare il tessuto sano da quello neoplastico. Tra questi, sulla base dell'espressione e la distribuzione in clusters caratteristici della patologia, è stato selezionato il cluster miR-449 (miR-449a, miR-449b, miR-449c). Il miR-449a è stato successivamente validato sulla popolazione di pazienti con papilloma invertito naso-sinusale mediante RT-PCR quantitativa (qPCR).
I geni target dei miRNAs significativamente deregolati nel papilloma invertito sono stati predetti usando l'algoritmo DIANA-TOOLS mirpath v.3.

Risultati: dall'analisi di sequenziamento dei tessuti di SNIP mediante la metodica NGS sono stati individuati miRNAs deregolati nel tessuto patologico rispetto alla corrispondente parte sana. Nel papilloma invertito naso-sinusale il cluster miR-449 (miR-449a, miR-449b, miR-449c) risulta significativamente sovra-espresso nel tessuto patologico rispetto al tessuto sano ($p < 0.05$). Nel carcinoma squamocellulare naso-sinusale, al contrario, il cluster miR-449 (miR-449a, miR-449b, miR-449c) risulta significativamente sotto-espresso nel tessuto patologico rispetto al tessuto sano ($p < 0.05$).

Conclusioni: il nostro studio fornisce la prima evidenza di una iperespressione del cluster miR-449 (miR-449a, miR-449b, miR-449c) nel papilloma invertito naso-sinusale e di una ipoespressione del cluster miR-449 (miR-449a, miR-449b, miR-449c) nel carcinoma squamocellulare naso-sinusale, suggerendo che la mutazione del cluster miR-449 (miR-449a, miR-449b, miR-449c) in combinazione con ulteriori eventi genetici ed epigenetici potrebbe svolgere un ruolo significativo nella patogenesi del SNIP e nella sua trasformazione neoplastica maligna in SNSCC.

CAPITOLO I

PAPILLOMA INVERTITO NASO-SINUSALE

INTRODUZIONE

Il papilloma invertito naso-sinusale è una neoplasia epiteliale benigna che origina dalla membrana schneideriana, mucosa respiratoria naso-sinusale di derivazione ectodermica, la quale differisce embriologicamente dalla mucosa di derivazione endodermica delle vie respiratorie superiori[1].

Questo particolare epitelio può dare origine a 3 tipi istologicamente distinti di papillomi:

Papilloma invertito.

Papilloma esofitico (fungiforme, settale, squamoso).

Papilloma oncocitico (a cellule cilindriche e colonnari).

Nel 1854, Ward e Billroth[2] per primi hanno documentato l'insorgenza di un papilloma nella cavità naso-sinusale; Kramer e Som[3] nel 1935 hanno distinto queste entità dai semplici polipi e Reingertz[4] nel 1938 è stato il primo a descrivere la capacità di proliferazione dell'epitelio neoplastico all'interno del tessuto stromale connettivale, definendo il termine "invertito".

Da allora, diversi nomi sono stati utilizzati per caratterizzare questi 3 diversi tipi di papilloma, finché, nel 1991, la WHO (World Health Organization) ha definitivamente classificato i papillomi naso-sinusali in 3 diversi sottotipi istopatologici: invertito, esofitico e oncocitico[5].

I papillomi naso-sinusali rappresentano lo 0,4%-4,7% di tutti i tumori nasali e il 2-3% dei polipi nasali con un'incidenza compresa tra 0,74 e 1,5 casi su 100.000 abitanti l'anno[6,7].

I papillomi invertiti e i papillomi esofitici sono i sottotipi più frequentemente diagnosticati, ognuno dei quali costituisce quasi la metà di tutti i papillomi naso-sinusali, mentre i papillomi oncocitici sono gli istotipi più rari e vengono riscontrati nel 3%-5% dei casi[8,9].

La maggior parte dei papillomi naso-sinusali insorge, negli individui caucasici, tra la 4ª e la 6ª decade di vita con una predominanza nel sesso maschile (rapporto maschio/femmina variabile da 3:1 a 8:1) per i papillomi invertiti ed esofitici, mentre gli oncocitici non mostrano predilezione di sesso[1,7,10]. Sono stati anche descritti casi isolati di papilloma invertito in età pediatrica[11].

Il papilloma invertito ed oncocitico originano generalmente dalla parete nasale laterale, dal seno etmoidale, dal seno mascellare e meno comunemente, dai seni frontale e sfenoidale,

mentre i papillomi esofitici insorgono quasi esclusivamente dal setto nasale[7,12].

I papillomi invertiti si presentano solitamente come neoformazioni unilaterali (più del 90% dei casi) con ostruzione nasale quale unico sintomo d'insorgenza, ma è stato descritto un coinvolgimento naso-sinusale bilaterale in una percentuale di pazienti che va dall'1% al 9%[13,14].

Anche se istologicamente benigni i papillomi invertiti hanno un decorso clinico potenzialmente aggressivo, in ragione della possibile multicentricità della lesione, dell'alta incidenza di recidiva, e della possibile associazione con il carcinoma squamocellulare sincrono o metacrono[12].

La trasformazione maligna del papilloma naso-sinusale è stata descritta nei sottotipi oncocitico e invertito ma non in quello esofitico. L'istotipo maligno prevalentemente associato ai papillomi invertiti è il carcinoma squamocellulare, sebbene siano stati descritti anche il carcinoma verrucoso e l'adenocarcinoma. Al contrario il carcinoma mucoepidermoide e i carcinomi naso-sinusali indifferenziati sono stati descritti nel papilloma oncocitico[7,12].

VALUTAZIONE ISTOPATOLOGICA

Il papilloma invertito origina dalla membrana di Schneider, che deriva dalla invaginazione ectodermica, nel primo trimestre di vita fetale, del placode nasale che forma il sacco nasale e in seguito le cavità nasali e paranasali (p. schneideriano)[1].

La cavità nasale, fatta eccezione per la mucosa olfattoria, è caratterizzata da una mucosa di origine ectodermica (mucosa Schneideriana) che può spiegare la speciale morfogenesi del PI e contraddistinguerlo dai papillomi esofitici a cellule squamose derivanti dalla mucosa del restante tratto respiratorio superiore, che invece ha origine embriologica endodermica.

Il termine papilloma invertito descrive l'aspetto istologico di una crescita prevalentemente endofitica o invertita dell'epitelio nello stroma sottostate, senza il superamento della membrana basale che separa e delinea la componente epiteliale dallo stroma connettivale mentre, a livello superficiale, un epitelio di tipo squamoso metaplastico rimpiazza quello respiratorio[1] (Fig. 1).

La crescita cellulare prende origine dallo strato basale della mucosa, con conservazione delle cellule ciliate; essa avviene in strati successivi, formati da cellule transizionali, di aspetto intermedio tra le colonnari e le squamose, da cellule metaplasiche e da cellule squamose mature, tutte con scarsa attività mitotica, senza atipie.

Del tutto tipico è il fatto che questa crescita cellulare epiteliale pluristratificata si spinge in profondità (è "invertita"), introflettendosi con cordoni solidi all'interno di uno stroma fibrillare più o meno vascolarizzato e infiltrato da elementi plasmacellulari e polimorfonucleati, scompaginando le sottostanti ghiandole sieromucose fino a porsi a contatto con la parete ossea.

Macroscopicamente i papillomi invertiti differiscono dai polipi infiammatori perché appaiono di dimensioni maggiori, di maggior consistenza, con minor edema, perdono l'aspetto translucido assumendo un colore grigiastro e presentano una superficie multi nodulare ed irregolare.

I cambiamenti infiammatori nell'osso sottostante sono vari e comprendono l'ispessimento periostale con aree di sclerosi focale e di produzione attiva di osso neoformato da parte degli osteoblasti (osteosintesi osteoblastica). Questo osso immaturo non solo rappresenta una minore barriera di protezione contro l'azione erosiva del papilloma, ma può anche formare delle "fessure" nelle quali l'epitelio si inserisce e rimane intrappolato. In un interessante e ben condotto studio di Chiu et al.[15], nel 22% dei campioni istologici esaminati, sono stati riscontrati dei resti di mucosa dall'aspetto normale, localizzati in profondità in una sottostante "fessura" dell'osso. Queste aree possono rappresentare delle potenziali fonti di recidiva o di localizzazione neoplastica microscopica[15].

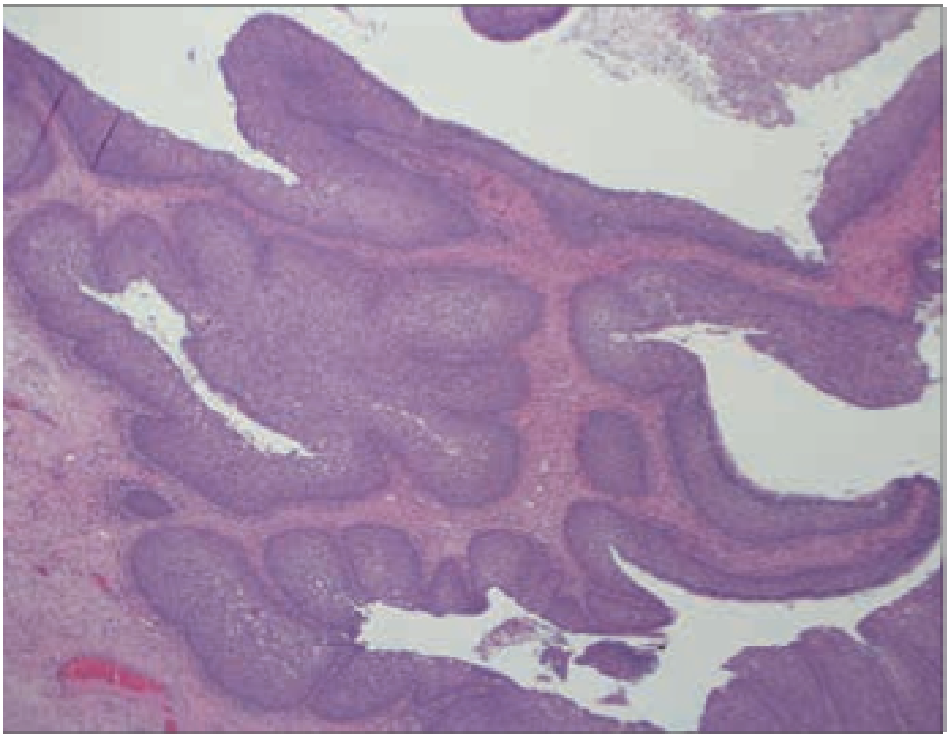


Fig. 1: Aspetto istologico (Ematossilina-Eosina) di papilloma invertito naso-sinusale.

Il rilievo e la contemporanea presenza di determinati parametri istologici può essere utile nel predire il decorso clinico del papilloma invertito[16].

Una evoluzione benigna (assenza di malignità o di recidive multiple) è correlata alla presenza di poliposi infiammatoria e all'assenza di ipercheratosi.

La possibile comparsa di recidive multiple (senza malignità) sembra associata ad un aumento dell'ipercheratosi, alla presenza di iperplasia epiteliale squamosa e ad un aumento della attività mitotica superficialmente allo strato basale.

Il rischio di una degenerazione maligna è associato alla presenza di invasione ossea, all'assenza di polipi infiammatori, ad un aumento dell'ipercheratosi, alla presenza di iperplasia epiteliale squamosa, ad un aumento dell'indice mitotico ed un decremento del numero di eosinofili.

EZIOLOGIA E PATOGENESI

L'eziologia del papilloma invertito naso-sinusale è sconosciuta e la sua esatta patogenesi non è stata ancora ben definita. Probabilmente si tratta di una patologia multifattoriale con un "range di ipotesi eziologiche" che includono l'infezione virale (HPV), l'infiammazione cronica, l'inquinamento ambientale e l'esposizione occupazionale (fumi di saldatura, composti di nickel e idrocarburi organici)[17]. In particolare alcune specifiche esposizioni occupazionali industriali sembrano rappresentare un'importante fattore di rischio per il papilloma invertito. Un recente studio evidenzia, al riguardo, una significativa associazione e una correlazione dose-risposta tra l'esposizione occupazionale a solventi organici e la neoplasia[18].

Papilloma invertito naso-sinusale e HPV

Nonostante l'HPV sia stato proposto come il principale fattore eziologico, il suo ruolo nella genesi e/o nella trasformazione dei papillomi invertiti naso-sinusali è ancora controverso tanto che il virus è ritenuto da alcuni come un'importante fattore eziologico e da altri come mera colonizzazione accidentale.

L'HPV è un virus a DNA oncogenico a trofismo epiteliale con 8000 paia di basi e oltre 100 sottotipi, associato ad un alto numero di infezioni dermatologiche, infezioni delle mucose e neoplasie.

La presenza dell'HPV- DNA nei papillomi naso-sinusali è stata dimostrata per la prima volta nel 1986-1987[19]. Il riscontro dell'HPV nei papillomi invertiti naso-sinusali varia enormemente nella letteratura con un range compreso tra lo 0% e il 72% e una media di circa il 25%[20,25]. Secondo una recente meta-analisi la presenza dell'HPV è stata riportata nel 7% della mucosa nasale normale, nel 4,1% dei polipi nasali infiammatori e nel 38,8% dei papillomi[24].

Gli HPV rilevati nel papilloma invertito sono più comunemente i sottotipi a basso rischio 6 e 11 e i sottotipi ad alto rischio 16 e 18. Gli HPV 6 e 11 sono più comuni rispetto al 16 e al 18 con un rapporto complessivo di sottotipi a basso e ad alto rischio di 2,8:1[25].

La presenza dell'HPV è aumentata nei papillomi invertiti con un alto grado di displasia e/o con carcinoma sincrono/metacrono, e in questi casi la tipizzazione del virus rivela un'alta proporzione di sottotipi ad alto rischio[25].

I meccanismi oncogenici dell'HPV ad alto rischio nei tumori di testa e collo sono stati estensivamente studiati e descritti, ma il loro ruolo nella patogenesi del papilloma invertito non è ancora chiaro.

L'HPV si integra nel DNA genomico della cellula ospite (promuovendo la stabilità del virus) e la sua attività oncogena è dovuta principalmente all'azione di 2 oncoproteine virali: E6 ed E7[19].

È stato descritto come l'HPV aumenti l'espressione del recettore per il fattore di crescita epidermoide (EGFR), attraverso un incremento diretto della sua trascrizione, mediato da E6[25]. Scheel et al.[25] hanno evidenziato che l'EGFR è l'unico biomarker iperespresso nei campioni positivi all'HPV a basso rischio e correlati ad un alto grado di displasia e malignità, suggerendo che una terapia a base di anti-EGFR possa ricoprire un ruolo nel ridurre il rischio di progressione neoplastica dei papillomi invertiti positivi all'HPV.

La oncoproteina virale E6 si lega alla p53 wild-type attraverso un passaggio adenosina-3-fosfato dipendente, determinando la sua degradazione e inattivazione[25,26].

L'oncoproteina E7 si lega e inattiva la funzione di pRb (proteina del retino- blastoma), inducendo l'iperespressione della p16 (proteina della famiglia CDKI in grado di bloccare il ciclo cellulare ed impedire la mitosi), che controlla una fase di transizione cruciale tra G1 e S[25,26].

Il gene p53 è un gene oncosoppressore, localizzato nel braccio corto del cromosoma 17, che riveste un importante ruolo nel regolare le dinamiche del ciclo cellulare. La corrispettiva proteina p53, il "guardiano del genoma", sopprime l'inappropriata proliferazione cellulare attraverso i

suoi effetti sulla apoptosi (morte cellulare programmata), sulla senescenza (arresto irreversibile della crescita), e sulla riparazione del DNA (arresto transitorio del ciclo cellulare) in risposta ad un danno del DNA.

Una mutazione nel gene oncosoppressore p53 rappresenta una delle più frequenti alterazioni genetiche nella patogenesi dei tumori umani e la sua proteina mutata porta ad una alterazione nella regolazione del ciclo cellulare e ad una stimolazione della proliferazione cellulare.

Diverse evidenze suggeriscono che la trasformazione maligna nel papilloma invertito possa essere legata ad alterazioni nelle proteine del ciclo cellulare (p53, p16, pRb, p21, p27, ciclina D1 e ki-67) che, determinando una incontrollata proliferazione di cellule epiteliali, promuovono l'oncogenesi[23,24].

Altavilla et al.[23] hanno evidenziato come la presenza dell'HPV-DNA, rilevata nel 70% dei casi di una serie di 20 pazienti affetti da papilloma invertito, fosse correlata ad una iperespressione immunoistochimica della p53, che a sua volta veniva associata a displasia ed a conseguente rischio di trasformazione maligna.

Ci sono, tuttavia, diversi studi che contraddicono il valore e l'importanza, come biomarker, delle proteine del ciclo cellulare nei papillomi invertiti naso-sinusali[27].

Scheel et al. hanno evidenziato che i livelli di p16 e p21 sono ridotti nei papillomi invertiti con HPV ad alto rischio, se comparati a quelli senza infezione da HPV[25].

Lin et al. hanno rilevato una bassa espressione di p16 e una iperespressione di p53 nei papillomi invertiti associati a carcinoma squamocellulare[28].

Uno studio recente mostra una bassa prevalenza di HPV in 73 papillomi naso-sinusali; inoltre un'alta espressione di p21 e una ipoespressione di p53 suggeriscono un meccanismo di regolazione non p53-dipendente[29].

Ci sono molte possibili ragioni che possono giustificare questa discordanza di risultati:
la procedura di rilievo del virus utilizzata dai diversi laboratori, i diversi primers usati nella PCR (Polymerase Chain Reaction) e la contaminazione durante il processamento dei campioni (rischio di falsi positivi).

Suggeriamo che un futuro confronto dei risultati tra differenti centri di ricerca debba richiedere la standardizzazione dei seguenti parametri:

1. Rigorosi criteri istologici per la classificazione dei 3 tipi di papilloma naso-sinusale per assicurare che lo stesso tipo di tumore sia selezionato per la valutazione;
2. Uno studio prospettico che utilizzi campioni a fresco e congelati (sia tumorali che di controllo) invece di un'analisi retrospettiva di campioni tessutali archiviati e fissati in formalina, al fine di migliorare la ricerca dell'HPV (la percentuale di riscontro dell'HPV nei campioni tessutali fissati in formalina scende del 20% ad 1 anno e del 28% a 6 anni[31]);
3. L'uso di una tecnica standardizzata (la PCR è il metodo di indagine da preferire) con appropriati controlli e meticolose procedure di laboratorio per minimizzare il rischio di contaminazione. Jenko et al.[30] hanno di recente riassunto i risultati di 16 studi che hanno utilizzato esclusivamente la PCR per determinare l'infezione da HPV.

Ci sono argomentazioni a favore dell'ipotesi che l'infezione da HPV rappresenti una colonizzazione incidentale piuttosto che un importante fattore eziologico nell'eziopatogenesi del papilloma invertito e/o del papilloma invertito con carcinoma squamocellulare[30,31]:

1. Il tipo di HPV più frequentemente rinvenuto nei papillomi invertiti è il sottotipo 11, a basso rischio;
2. La costante unilateralità e specificità di localizzazione (parete laterale nasale);
3. Il rarissimo riscontro in età pediatrica a dispetto del fatto che i bambini sono più suscettibili alle infezioni virali rispetto all'adulto.

Nell'insieme, i dati controversi sul ruolo dell'infezione da HPV nella genesi e/o trasformazione del papilloma invertito naso-sinusale non permettono, al momento, alcuna conclusione e sottolineano che altri meccanismi oltre all'integrazione dell'HPV operano nella progressione neoplastica dei papillomi schneideriani. L'infezione da HPV, quindi, potrebbe rappresentare solo il primo step di un evento multifasico in cui sono coinvolti altri meccanismi molecolari genetici e/o epigenetici[32].

TRASFORMAZIONE MALIGNA

Il papilloma invertito può essere associato a vari gradi di alterazione epiteliale: atipia, displasia, carcinoma in situ e carcinoma squamocellulare[12]. Sono stati inoltre descritti l'adenocarcinoma, il carcinoma mucoepidermoide, il carcinoma naso-sinusale indifferenziato, il carcinoma a piccole cellule e il carcinoma NOS (non altrimenti specificato)[12].

Il carcinoma squamocellulare associato al papilloma naso-sinusale ha spesso un alto grado di differenziazione e una prognosi migliore, rispetto al carcinoma squamocellulare primitivo. Anche nella fase avanzata della malattia, le metastasi linfonodali sono rare[12].

L'associazione tra le due forme neoplastiche (papilloma invertito e carcinoma) si può verificare sia come tumori sincroni, cioè originati contemporaneamente nella stessa sede senza evidenza certa che sia il papilloma invertito a dare origine al carcinoma (la eventualità più frequente sembra sia quella che il carcinoma possa originare dai cambiamenti displastici dell'epitelio naso-sinusale adiacente), sia sotto forma di tumori metacroni, cioè il carcinoma si manifesta nella sede dal quale un papilloma invertito è stato precedentemente rimosso[33].

Revisioni accurate della letteratura e i dati provenienti dalle più ampie serie concordano nell'indicare che l'incidenza del papilloma invertito associato al carcinoma squamocellulare sia compresa tra il 5 e il 10% (0,33 casi per milione di abitanti l'anno)[8,34].

In una metanalisi di 63 lavori, comprendenti oltre 2000 pazienti affetti da papilloma invertito, Mirza et al.[34] hanno riscontrato che l'incidenza del carcinoma sincrono (carcinoma evidenziato nella exeresi tumorale iniziale) con il papilloma invertito era del 7,1%, mentre l'incidenza del carcinoma metacrono era del 3,6%. Questi dati, tuttavia, potrebbero essere stati sovrastimati a causa della provenienza da centri di riferimento di terzo livello ("referral bias").

Diversi sono i parametri istopatologici utili nel predire il decorso clinico del carcinoma squamocellulare associato al papilloma invertito; in particolare l'ipercheratosi, l'iperplasia epiteliale squamosa e l'alto indice mitotico si sono dimostrati degli indici prognostici negativi[16].

I criteri istologici e il profilo immunoistochimico per definire la trasformazione maligna non sono stati ancora ben definiti. Le caratteristiche istologiche di malignità includono le mitosi atipiche, la necrosi, l'invasione ossea, l'invasione linfovascolare, la riduzione del numero dei neutrofili, la maturazione paradossa, la discheratosi e/o l'invasione perineurale[16].

Il carcinoma squamocellulare può caratterizzare l'intera lesione o il papilloma invertito può essere la componente dominante con solo un'area solitaria di carcinoma, e, in generale, la percentuale della componente maligna può variare dal 10% al 95% del volume complessivo della neoplasia[35].

Inoltre, non è stata dimostra alcuna correlazione tra la percentuale di cellule maligne riscontrata nel papilloma invertito e il grado di differenziazione neoplastica e/o l'outcome clinico del paziente[33].

La biopsia preoperatoria potrebbe non rappresentare un metodo efficace e sicuro nell'identificare i papillomi invertiti naso-sinusali maligni poiché la trasformazione maligna origina, nella maggioranza dei casi, dal centro della neoplasia e l'esame istopatologico del tessuto biopsiato potrebbe non rilevare la presenza di malignità; sono quindi necessarie biopsie preoperatorie multiple ed ottenute da diverse aree del tessuto tumorale, possibilmente vicino all'area centrale del tumore, al fine di prevenire una diagnosi errata[36].

Dopo l'intervento chirurgico tutto il tessuto dovrebbe essere attentamente esaminato su sezioni multiple alla ricerca della presenza di aree di carcinoma. Inoltre, quando vengono utilizzate strumentazioni motorizzate quale il "Debrider", è obbligatorio abbinare ad esso dispositivi che permettano di raccogliere il tessuto aspirato[36].

GENETICA

Il papilloma invertito naso-sinusale si sviluppa da una progressiva serie di cambiamenti istologici nei quali l'epitelio colonnare respiratorio è rimpiazzato gradualmente da una metaplasia squamosa invertita; successivamente la metaplasia può trasformarsi in displasia squamosa e a questa possono far seguito il carcinoma in situ e il carcinoma squamocellulare invasivo.

L'identificazione e la caratterizzazione degli eventi molecolari (alterazioni genetiche ed epigenetiche) che attraverso l'attivazione di oncogeni e l'inattivazione di oncosoppressori portano alla trasformazione maligna del papilloma invertito naso-sinusale, sono necessari per comprendere la biologia tumorale e favorire la scoperta di marker prognostici e di potenziali target molecolari per protocolli terapeutici mirati.

Ad oggi non esistono regimi di terapie target molecolari per i tumori maligni del distretto naso-sinusale.

In riferimento ai meccanismi di carcinogenesi, la ricerca attuale è incentrata su 2 punti:

lo squilibrio tra proliferazione cellulare ed apoptosi e l'oncogenesi mediata da meccanismi infiammatori[37].

L'infiammazione cronica è un fattore di rischio ben noto per diverse neoplasie maligne, in particolare del tratto gastrointestinale, e i meccanismi che legano l'infiammazione e il cancro sono in parte noti.

Le molecole che fanno da ponte tra l'infiammazione cronica e la carcinogenesi maggiormente studiate sono le ciclossigenasi-2 (COX-2), enzimi che catalizzano la sintesi di prostaglandine a partire dall'acido arachidonico. La ciclossigenasi-2 è indotta da stimoli infiammatori e mitogeni e promuove la carcinogenesi attraverso la stimolazione della neoangiogenesi, l'inibizione dell'apoptosi e l'alterazione delle molecole di adesione cellulare[37].

La ciclossigenasi-2 risulta iperespressa nei papillomi invertiti naso-sinusali e potrebbe ricoprire un ruolo importante nel processo di trasformazione maligna a carcinoma squamocellulare, dal momento che l'espressione della ciclossigenasi-2 è significativamente aumentata nei papillomi invertiti con carcinoma squamocellulare rispetto ai papillomi benigni[38].

Il bersaglio terapeutico-farmacologico della COX-2 potrebbe rappresentare nel prossimo futuro una opzione terapeutica addizionale in casi selezionati di papilloma invertito con recidive multiple o inoperabile[39].

È stato più volte rilevato che alterazioni nell'espressione di proteine intracellulari coinvolte nel ciclo cellulare e nell'apoptosi, inclusi i fattori proapoptotici come p53, p21, p16, p27 (geni oncosoppressori) e p63 (gene oncosoppressore), la famiglia delle bcl-2, il marker di proliferazione cellulare ki-67 e PCNA (antigene di proliferazione cellulare nucleare), contribuiscano alla trasformazione maligna da papilloma invertito a carcinoma squamocellulare[40,41].

p53, p16 e p21 sono iperespresse nei papillomi invertiti con displasia severa e con trasformazione maligna, se comparati alla mucosa nasale di controllo[40,41], e i papillomi invertiti con carcinoma presentano una colorazione positiva per p53 più che doppia rispetto ai semplici papillomi invertiti (62% contro 30%)[28].

È noto che la proteina tumorale p53 assume un ruolo chiave nella progressione tumorale; la p53 wild-type riduce infatti la proliferazione delle cellule maligne attraverso l'arresto della crescita o l'apoptosi e sopprime la trascrizione della COX-2. La mutazione della p53 determina quindi l'up-regulation della COX-2[38].

Alcuni autori hanno riscontrato nei papillomi invertiti con displasia severa e con carcinoma squamocellulare invasivo una aumentata attività proliferativa delle cellule tumorali (Ki-67 significativamente elevato), un'elevata espressione di PCNA e una ridotta espressione di p27[41,42].

PCNA, ki-67 e p27 potrebbero interagire con CDK1 (kinasi 1 ciclina-dipendente – proteina che gioca un ruolo chiave nella regolazione del ciclo cellulare) e promuovere l'ingresso della cellula nel ciclo cellulare, con conseguente proliferazione e cancerizzazione[41,42].

Altri autori hanno evidenziato che l'immunoespressione nucleare della survivina (proteina inibitrice dell'apoptosi), e l'immunoespressione dell'oncoproteina Bcl-2 sono significativamente più elevate nel papilloma invertito naso-sinusale suggerendo che queste due molecole possano essere coinvolte nella carcinogenesi[43].

L'antigene del carcinoma squamocellulare (SCCA) è una proteina citoplasmatica (inibitore della serin-proteasi) riscontrata nel normale epitelio squamoso e in livelli significativamente elevati nei tessuti tumorali, come anche nel siero, di pazienti con carcinoma squamocellulare[44].

SCCA è un antigene associato alle neoplasie epiteliali maligne che fu per la prima volta isolato dal carcinoma squamocellulare della cervice uterina[44].

Recenti studi hanno indicato che SCCA può ricoprire un ruolo come mediatore dell'apoptosi[45] e Yasumatsu et al.[46] hanno per primi evidenziato che i livelli sierici di SCCA sono elevati in pazienti con papillomi invertiti del distretto naso-sinusale. Questi autori hanno osservato che l'89% (25/28) dei pazienti con papilloma invertito e il 90,3% dei soggetti con papilloma invertito recidivato, presentano livelli di SCCA sierico significativamente più elevati se confrontati a pazienti con patologia infiammatoria. Yasumatsu et al.[46] hanno riscontrato una chiara e significativa relazione tra i livelli di SCCA e la classificazione di Krouse (volume tumorale). Anche piccoli papillomi invertiti che non vengono rilevati dall'imaging sono stati identificati dai livelli di SCCA, i quali, inoltre, si riducono in tutti i casi dopo la exeresi chirurgica della neoplasia.

Gli autori[46] concludono che SCCA potrebbe rappresentare un potenziale biomarker tumorale diagnostico molto utile e con alta sensibilità e specificità nel papilloma invertito naso-sinusale. Il monitoraggio dei livelli di SCCA nei pazienti con papilloma invertito potrebbe portare ad un

miglioramento delle procedure diagnostiche (scelta tra TC e RMN), del trattamento chirurgico e del follow-up postoperatorio (tempestivo rilievo delle recidive)[47].

È stato suggerito che la perdita delle molecole di adesione intracellulare, contribuisca alla trasformazione maligna da papilloma invertito a carcinoma squamocellulare[48].

E-caderina e catenina sono molecole che mediano l'adesione tra cellula e cellula nell'epitelio normale. Un'espressione alterata di queste molecole di adesione determina una riduzione dell'adesione intracellulare, con una possibile trasformazione della cellula e progressione tumorale.

Koo et al.[48] hanno evidenziato che una ridotta espressione di E- caderina e catenina nella membrana cellulare può essere associata alla carcinogenesi dei papillomi invertiti naso-sinusale e può aiutare a predire la trasformazione maligna degli stessi.

La fascina è una proteina legante l'actina richiesta per la formazione di protrusioni sulla superficie cellulare, indispensabile per la mobilità cellulare, e aumenta la motilità cellulare nell'epitelio trasformato. L'iperespressione di fascina è significativamente più comune nei papillomi invertiti naso-sinusali con un alto grado di displasia rispetto a quelli senza displasia o all'epitelio displastico di basso grado e può essere associata a progressione tumorale e a trasformazione maligna[49].

I desmosomi sono giunzioni intracellulari complesse che ancorano il filamento di citoscheletro intermedio alla membrana cellulare per formare strutture di adesione specializzate tra cellula e cellula, essenziali per mantenere l'integrità e l'architettura tissutale.

La desmogleina 3 (DSG3) è una glicoproteina transmembrana da 130 kDa che risulta iperespressa nel carcinoma squamocellulare (90%), nel papilloma invertito e nel papilloma invertito con carcinoma squamocellulare[50]. L'espressione di DSG3 potrebbe essere correlata alla trasformazione architetturale di questi tumori ed è associata alla trasformazione maligna del papilloma invertito. In particolare lo studio condotto da Huang et al.[50] ha sottolineato che la

desmogleina 3 potrebbe essere presente in alcune aree del papilloma invertito (53%), circostanza questa che, se venisse confermata, aiuterebbe a predire la trasformazione neoplastica maligna e a rafforzare la modalità di follow-up.

L'angiogenesi rappresenta un importante step nella progressione tumorale.

TFPI-2, un inibitore della serina proteinasi da 32 kDa, (un gene oncosoppressore con un ruolo anti-angiogenico), è un potenziale inibitore dell'invasione tumorale e delle metastasi. La ridotta espressione di TFPI-2 nei papillomi invertiti naso-sinusali con carcinoma squamocellulare, inversamente correlato all'aumento dell'espressione del VEGF (fattore di crescita vascolare endoteliale), contribuirebbe all'angiogenesi e potrebbe portare alla trasformazione maligna del papilloma invertito[51].

L'angiomiotina è una proteina recentemente scoperta che regola la migrazione e la formazione dei tubuli nelle cellule endoteliali. L'angiomiotina influenza l'angiostatina (un inibitore circolante dell'angiogenesi), e stimola l'angiogenesi. L'angiomiotina è iperespressa nei papillomi invertiti e sembra associarsi alla progressione e alla crescita del papilloma invertito attraverso l'induzione dell'angiogenesi[52].

L'osteopontina (OPN) è una proteina coinvolta nella sopravvivenza cellulare, nell'immunità e nella progressione tumorale. OPN e VEGF sono iperespresse nel papilloma invertito naso-sinusale ed in particolare negli stadi avanzati, suggerendo che l'asse OPN-VEGF contribuisca alla progressione tumorale stimolando l'angiogenesi[53].

È stato inoltre segnalato che la down-regulation della catepsina S (un enzima lisosomiale che svolge un ruolo critico nell'angiogenesi e nella presentazione dell'antigene) e l'up-regulation del suo inibitore endogeno stefina sono presenti nel papilloma invertito rispetto alla normale mucosa naso-sinusale[54].

Durante l'ultima decade sono state messe a punto diverse terapie target molecolari, come ad esempio quella relativa alla mutazione del recettore del fattore di crescita epidermoidale

(EGFR).

È interessante notare come l'amplificazione di EGFR e FGFR-1 (recettore per il fattore di crescita fibroblastico) è stata rilevata nei papillomi invertiti con carcinoma squamocellulare[28,55].

Se i trial clinici in corso dimostreranno l'efficacia degli inibitori dell'FGFR-1 nei pazienti con tumori con FGFR1 amplificato, si porranno le basi per una futura terapia target molecolare.

Diversi studi hanno inoltre indicato che l'aumento dei linfociti T natural regulatory CD4+, CD25+ e Foxp3+ (cellule T che modulano il sistema immunitario ed esprimono i biomarcatori CD4, Foxp3, CD25) in varie neoplasie maligne possa contribuire alla progressione tumorale bypassando il riconoscimento immunitario e promuovendo un ambiente immunodepresso, situazioni queste associate ad una peggior diagnosi e ad una ridotta sopravvivenza[56,57].

Recenti evidenze confermano che i pazienti con carcinoma squamocellulare della testa e del collo hanno dei livelli aumentati di cellule nTreg con una più alta attività di soppressione se confrontati ai controlli sani, ed alcuni studi sottolineano che questa popolazione cellulare nTreg giochi un ruolo critico nella soppressione della risposta immunitaria contro il tumore contribuendo alla progressione tumorale[57].

Gu et al. hanno dimostrato che le cellule nTreg esprimenti CCR4 sono significativamente più elevate nei papillomi invertiti naso-sinusali e nei carcinomi squamocellulari rispetto ai controlli sani[58].

La presenza di cellule nTreg funzionanti nel sangue periferico e/o nel sito tumorale dei pazienti può costituire un marker di progressione da papilloma invertito a carcinoma squamocellulare e potrebbe fornire il razionale per una nuova strategia immunitaria.

In particolare l'eliminazione delle cellule nTreg all'interno del microambiente tumorale, per esempio attraverso una micro-iniezione locale di anti-TGFb o anticorpi monoclonali anti-CCL22 (CCL22 è una proteina secreta dai macrofagi che interagisce con i recettori per le chemochine sulla superficie cellulare), potrebbe fornire un approccio terapeutico efficace contro il carcinoma

squamocellulare. In modo similare, anche una terapia target con agenti chimici potrebbe rappresentare un protocollo terapeutico alternativo.

La proteina strutturale da 190 kDa IQGAP1 è espressa in modo ubiquitario e partecipa alle interazioni tra proteina e proteina, integrando diversi segnali intercellulari. IQGAP1 è significativamente più elevata nei pazienti con papilloma invertito naso-sinusale associato a carcinoma squamocellulare, se confrontata al semplice papilloma invertito; ciò sta ad indicare che l'espressione di IQGAP1 partecipa alla trasformazione neoplastica.

Le metalloproteine (MT) sono proteine a basso peso molecolare (6-7 kDa), che si legano a metalli pesanti contenenti sulfidrili, influenzano l'omeostasi dei metalli intracellulari come cadmio, piombo, mercurio, zinco e rame e sono coinvolte in numerosi processi fisiopatologici, inclusa la protezione dalla tossicità da metalli e la regolazione di processi biologici, tra cui la proliferazione, l'apoptosi e l'invasione.

La trascrizione del gene MT (cambiamenti nel gene MT2A) è attivata in risposta ad un'ampia gamma di stimoli, inclusi agenti induttori di stress ossidativo, citochine, ormoni e agenti chimici vari[60].

Un recente studio[60] dimostra che il polimorfismo di MT2A potrebbe essere coinvolto nello sviluppo del papilloma invertito naso-sinusale, ma ulteriori e più ampi studi sono necessari per determinare l'esatto ruolo di MT2A nella carcinogenesi e nella fisiopatologia di queste patologie neoplastiche.

IMAGING

TOMOGRAFIA COMPUTERIZZATA

La TC con mezzo di contrasto è generalmente considerato l'esame di scelta nella valutazione preoperatoria delle lesioni espansive naso-sinusali. Tuttavia, i reperti TC comunemente osservati nel papilloma invertito naso-sinusale sono aspecifici e la sensibilità riportata è solo del 66%[13] (Fig. 2).

Anche se non ci sono rilievi di imaging patognomonici che distinguano il papilloma naso-sinusale dai polipi infiammatori o dalla sinusite cronica, alcuni reperti possono suggerirne la presenza. I segni TC suggestivi di papilloma includono la presenza di una massa a densità dei tessuti molli che interessa in modo uniforme ed unilaterale la cavità nasale e i seni paranasali contigui con un enhancement contrastografico eterogeneo e una diffusa osteite con iperostosi focale. Quando è presente erosione o distruzione ossea, si deve considerare la possibilità di una degenerazione maligna. L'iperostosi focale costituisce un eccentrico ispessimento osseo sclerotico che coinvolge solo una porzione limitata della parete di un seno para- nasale.

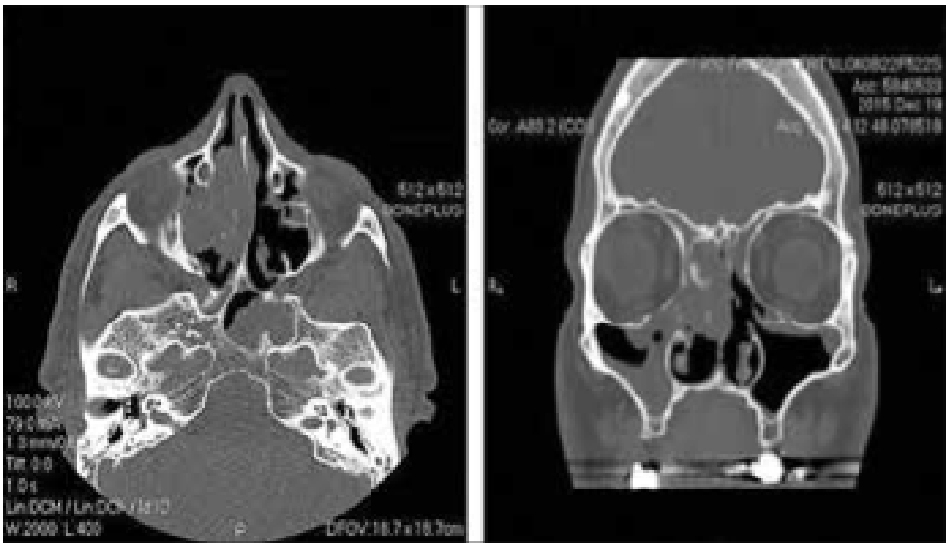


Fig. 2: TC pre-operatoria in proiezione assiale e coronale di papilloma invertito della fossa nasale destra.

Il termine osteite descrive i cambiamenti infiammatori dell'osso sinusale che risultano secondari alla perdita di spazio midollare. Il meccanismo attraverso il quale il papilloma invertito causa questa reazione ossea (ispessimento dell'osso) nella sede di origine del tumore è sconosciuto e potrebbe essere legato alla liberazione da parte delle cellule tumorali di particolari sostanze peptidiche morfogenetiche per l'osso e ad una alterazione della vascolarizzazione indotta dal tumore con conseguente irritazione dell'osso sottostante.

Le citochine infiammatorie, inoltre, influenzano la funzione osteoblastica promuovendo l'osteite rilevata nel papilloma invertito[61-64].

L'iperostosi focale viene evidenziata nel 63,2% dei pazienti con papilloma invertito e la localizzazione più frequente è sulla parete nasale laterale (52,6% dei casi)[63].

Due distinti pattern di iperostosi focale o ispessimento osseo localizzato sono associate al papilloma invertito. Un ispessimento osseo piatto "a placca" è riscontrato principalmente nell'iperostosi focale che coinvolge la parete laterale della cavità nasale, mentre, un ispessimento osseo a "forma di cono" ("bony strut" o "spicola ossea" – protrusione ossea allungata con una base stretta) viene rilevato solitamente sulle pareti dei seni paranasali o sul setto nasale osseo.

I rilievi alla TC di una iperostosi focale o di una "spicola ossea" ("bony strut") e di una osteite all'interno del seno opacizzato sono predittivi del sito di origine del papilloma invertito; negli studi prospettici, il rilievo di osteite focale nelle TC pre-operatorie dei seni paranasali sono suggestivi del corretto sito di origine del papilloma invertito nel 95% dei casi[61,64,65], mentre nelle analisi retrospettive la dimostrazione sulla TC di aree di iperostosi focale corrisponde all'origine della neoplasia (valutata chirurgica- mente) nell'89,1%[63].

Le immagini TC possono essere infine utilizzate per differenziare l'iperostosi focale (localizzata ed eccentrica) dall'ispessimento osseo diffuso e concentrico, il quale è di solito associato alla sinusite cronica[61,64,65].

RISONANZA MAGNETICA

Secondo Ojiri et al.[66] le limitazioni della TC possono essere superate con la RMN che, oltre a differenziare il tessuto neoplastico dal tessuto infiammatorio, identifica, nelle immagini pesate in T2 o T1, un "pattern convoluto-cerebriforme" suggestivo per il papilloma invertito in circa l'80% dei casi[66] (Fig. 3).

Il "Pattern convoluto cerebriforme" riflette l'architettura istologica della lesione (giustapposizione di diversi strati epiteliali e stromali che formano un pattern colonnare abbastanza regolare) e il rilievo alla RMN del "pattern cerebriforme colonnare" assume un valore predittivo positivo del 95,8%[13].

Inoltre la RMN è più sensibile della TC nel differenziare il papilloma invertito dalle secrezioni infiammatorie endosinusali (definendo l'estensione del tumore) e nell'identificare aree di possibile degenerazione maligna, attraverso una migliore definizione dell'interfaccia osso-lesione. Valuta inoltre una possibile estensione intracranica e intraorbitaria.

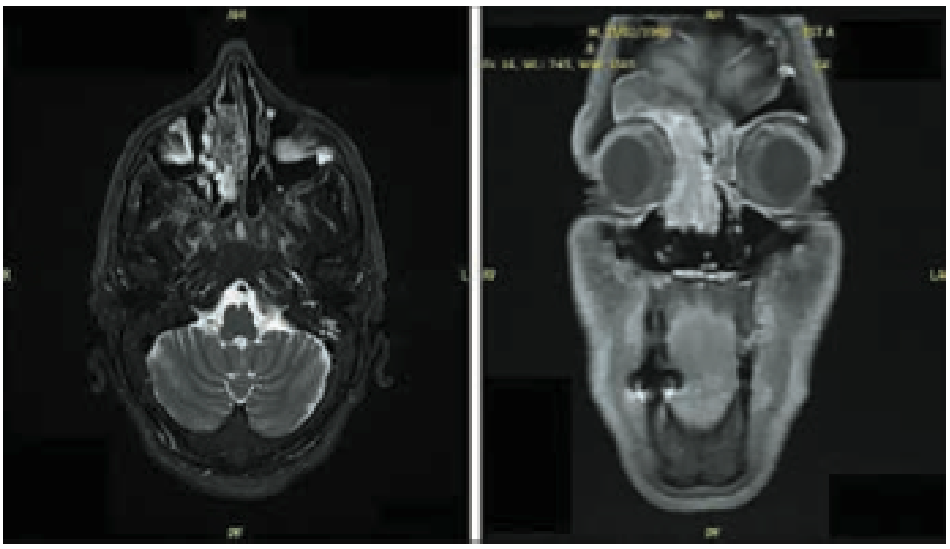


Fig. 3: RMN pre-operatoria in sequenza T2 pesata ed in proiezione assiale e coronale che evidenzia il classico "pattern convoluto-cerebriforme" di papilloma invertito della fossa nasale di destra.

Recenti esperienze hanno dimostrato che le alterazioni ossee utilizzate per predire il sito di origine del papilloma invertito possono anche essere identificate con la RMN; in questo caso i precoci cambiamenti osteitici appaiono come immagini ipointense nelle sequenze T1-pesate e come immagini iperintense nelle sequenzeT2-pesate[67].

L'associazione dell'aspetto colonnare con i cambiamenti ossei (rimodellamento vs erosione) permette la differenziazione tra il papilloma invertito e il tumore maligno[13].

Inoltre, Jeon et al. hanno suggerito che l'assenza localizzata del pattern convoluto-cerebriforme potrebbe essere suggestivo di una degenerazione maligna del papilloma invertito[68].

PET/TC

La PET/TC è un inaffidabile strumento per predire la malignità nel papilloma invertito, perché il tumore con o senza carcinoma squamocellulare ha mostrato degli alti livelli di captazione standardizzati (SUVs) e la differenza tra i SUVs non risulta significativa[68].

IMAGING PREOPERATORIO

Karkos et al.[69] hanno revisionato la letteratura alla ricerca del planning preoperatorio ideale per il papilloma invertito naso-sinusale. Da una selezione e analisi di 10 studi hanno concluso che, nei pazienti non operati, le immagini di RMN T2-pesate sono in grado di discriminare il papilloma invertito (segnale più chiaro) dai tessuti infiammatori (segnale intermedio) anche se la RMN può difficilmente differenziare una recidiva dal tessuto cicatriziale. Gli autori concludono, dunque, che la combinazione di TC e RMN resta ancora l'ideale planning pre-operatorio nel papilloma invertito naso-sinusale.

IMAGING CON SPETTROSCOPIA AD INFRAROSSI

L'associazione dei papillomi schneideriani con il carcinoma squamocellulare e la loro tendenza ad essere istologicamente confusi con le più comuni neoformazioni benigne come i polipi infiammatori naso-sinusali, rende necessaria la ricerca di nuove metodiche strumentali di diagnosi oltre alle già utilizzate tecniche istopatologiche, immunoistochimiche e radiologiche.

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIRI – Fourier transform infrared imaging) è uno strumento potente per analizzare i cambiamenti biochimici nei tessuti tumorali[70].

La FTIRI potrebbe rappresentare un valido strumento complementare nella valutazione clinica e prognostica, specialmente quando è impossibile formulare una diagnosi di certezza con i soli metodi convenzionali. È stato infatti dimostrato che FTIRI può cogliere a livello molecolare le modificazioni biologiche nei tessuti patologici, ancor prima che essi siano rilevati con l'uso di test diagnostici di routine.

La FTIRI, insieme alle procedure diagnostiche convenzionali, rappresenta una tecnica analitica obiettiva e ben collaudata per una corretta diagnosi di ambigue lesioni cancerogene e precancerogene. Attraverso l'acquisizione di immagini infrarosse dei campioni biologici (fluidi, cellule e tessuti), è possibile ottenere un'informazione affidabile e riproducibile riguardo alla loro composizione biochimica. In aggiunta, è possibile monitorare con un'elevata accuratezza i cambiamenti di composizione e di struttura causati da patologie tumorali, analizzando le conformazioni molecolari delle più importanti biomolecole.

Alcuni studi descrivono l'uso della spettroscopia ad infrarossi per individuare lesioni neoplastiche maligne in uno stadio molto precoce della patologia anche prima che possa essere rilevato alcun cambiamento morfologico[70].

In un nostro recente lavoro abbiamo applicato la FTIRI su differenti lesioni naso-sinusali infiammatorie e neoplastiche, come ad esempio polipi infiammatori, papillomi schneideriani e carcinomi indifferenziati[71]. Sono state acquisite immagini ottiche e ad infrarossi di ogni sezione istologica e sono state valutate le caratteristiche biomolecolari dell'epitelio e delle componenti connettivali evidenziando degli specifici marker spettrali di ogni patologia.

Per ogni sezione, in riferimento ai suggerimenti del patologo, sono state acquisite immagini chimiche ad infrarossi in specifiche aree, contenenti sia lo strato epiteliale che il vicino tessuto connettivo per localizzare la distribuzione dei lipidi, delle proteine e degli acidi nucleici all'interno delle aree valutate (Fig. 4). Abbiamo definito specifiche caratteristiche spettrali dei vari strati epiteliali e del vicino tessuto connettivale con l'obiettivo di discriminare lesioni maligne da quelle benigne ed infiammatorie (Fig. 5). Il nostro rappresenta il primo studio in letteratura che utilizzi la FTIRI come strumento per la diagnosi obiettiva di alcune lesioni naso-sinusali come i polipi infiammatori, i papillomi invertiti ed i carcinomi indifferenziati. Anche se i risultati già ottenuti sottolineano il potenziale valore diagnostico di questa innovativa metodica, la sua applicazione, nella pratica clinica di routine, richiede che i nostri dati siano validati su una più ampia coorte di pazienti.

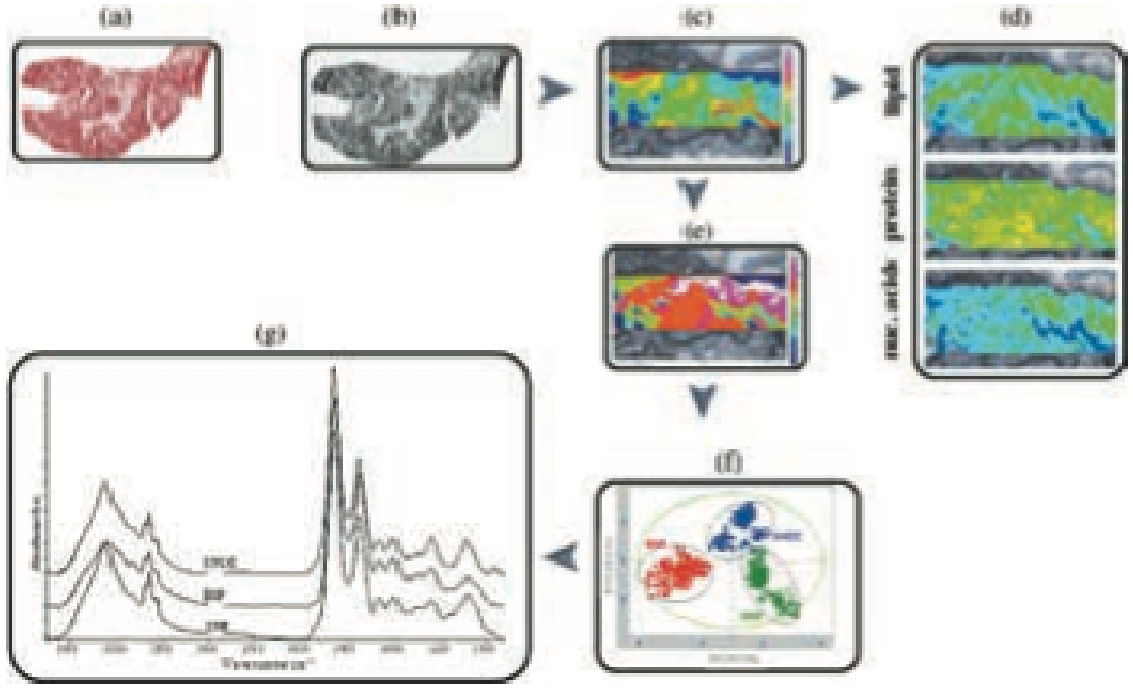


Fig. 4: Ciascun campione tessutale è stato sottoposto ad una analisi istologica (a) e ad una spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIRI – Fourier transform infrared imaging) (b) e sono state acquisite immagini ad infrarossi in specifiche aree (c), per localizzare la distribuzione dei lipidi, delle proteine e degli acidi nucleici (d). I dati spettroscopici sono stati sottoposti ad una analisi multivariata (e-f) per calcolare lo spettro medio di assorbimento dell'epitelio e del tessuto connettivale (g).

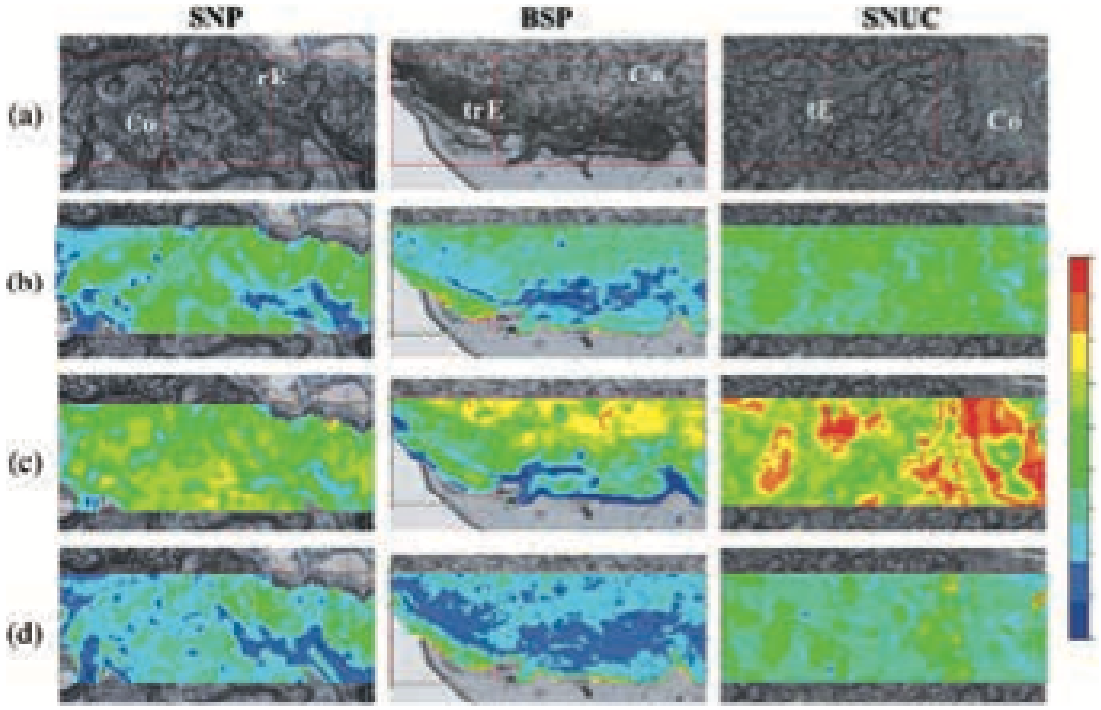


Fig. 5: Immagini di sezioni tessutali di polipi infiammatori naso-sinusali (SNP), di papillomi Schneideriani (BSP) e di carcinomi indifferenziati naso-sinusali (SNUC). Le aree sottoposte alla spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIRI – Fourier trans- form infrared imaging) comprendono varie componenti tessutali: epitelio respiratorio (rE), epitelio transizionale (trE), epitelio tumorale (tE) e tessuto connettivale (Co). Per ogni sezione, in base al differente spettro di assorbimento, è stato riportato il colore delle immagini corrispondente alla distribuzione dei lipidi, delle proteine e degli acidi nucleici.

STADIAZIONE

La stadiazione proposta da Krouse nel 2000 per i papillomi invertiti naso-sinusali continua ad essere la più utilizzata per valutare l'estensione della malattia[72] (Tab. 1).

Questa classificazione è stata completata da Cannady et al.[74] nel 2007, che ha raggruppato i pazienti in base al rischio di recidiva (Tab. 2). Unendo gli stadi 1 e 2 di Krouse in una sola categoria (stadio A) e mantenendo lo stadio 3 di Krouse come stadio B e lo stadio 4 di Krouse come stadio C, gli autori hanno dimostrato una differenza significativa nelle percentuali di recidiva fra i 3 gruppi.

Stadio 1	Malattia limitata solamente alla cavità nasale.
Stadio 2	Malattia limitata ai seni etmoidali e alle pareti mediali e superiori dei seni mascellari.
Stadio 3	Malattia coinvolgente le pareti laterali o inferiori dei seni mascellari o che si estende nei seni frontale o sfenoidale.
Stadio 4	Tumore diffuso al di fuori dei confini del naso e dei seni paranasali (3% nel rinofaringe, 2% nella fossa pterigopalatina e intracranica e 7% altrove[73] – queste ultime sedi atipiche sono probabilmente condizionate da migrazioni ectopiche della membrana schneideriana durante l'embriogenesi) o con associata qualsiasi trasformazione neoplastica maligna.

Tab. 1: Krouse staging system.

Gruppo A	Papilloma invertito confinato alla cavità nasale, ai seni etmoidali, o alla parete mascellare mediale.
Gruppo B	Papilloma invertito con coinvolgimento di qualunque parete mascellare (oltre che della parete mediale) o del seno frontale o del seno sfenoidale.
Gruppo C	Papilloma invertito con estensione oltre i seni paranasali. Il papilloma invertito con aspetti di malignità dovrebbe essere stadiato secondo le linee guida dell'American Joint Committee on Cancer.

Tab. 2: Cannady staging system.

TERAPIA CHIRURGICA

Il trattamento di elezione del papilloma invertito naso-sinusale è rappresentato dalla exeresi chirurgica, in particolare un esclusivo approccio endoscopico endonasale può essere considerato il gold standard nella maggior parte dei papillomi invertiti (più del 90% dei casi), mentre solo una minoranza dei casi (meno del 10%) richiede un trattamento chirurgico combinato o esterno[75-84].

Stammberger ha documentato, per la prima volta nel 1981, i risultati di 15 pazienti con papilloma invertito naso-sinusale trattati con un approccio puramente endoscopico[85].

Gli approcci esclusivamente endoscopici non possono sempre ottenere una resezione in blocco della neoplasia, ma ciò che conta, in questi casi, è l'exeresi radicale ottenuta al termine della procedura; risulta fondamentale cioè il raggiungimento di una resezione completa della lesione con margini istologici liberi (Tab. 3).

1. Diagnosi patologica preoperatoria
2. Debulking del tumore
3. Precisa identificazione del sito di adesione mucosale del tumore
4. Dissezione sottoperiostea del sito di adesione
5. Escissione del sito di adesione del tumore e della mucosa normale circostante
6. Controllo con esame istologico al congelatore
7. Resezione o fresatura del sito di adesione del tumore nell'osso sottostante

Tab. 3: Fasi della strategia chirurgica endoscopica "attachment-orientated".

La completa rimozione endoscopica della lesione (Fig. 6-7) è possibile solo quando siano rispettati alcuni determinati principi:

1. attenta valutazione pre-operatoria dell'imaging;
2. chirurgia orientata in base al punto di origine del papilloma invertito (attachment-oriented surgery): rimozione graduale della lesione in blocchi orientati, iniziando dalla porzione endonasale e raggiungendo progressivamente l'area di origine;
3. scollamento/dissezione sottoperiostea/sottopericondrale dei tessuti partendo dal tessuto sano circostante dai margini macroscopicamente liberi, procedendo in senso centripeto fino alla base ossea di impianto della lesione e successiva sua fresatura con frese taglienti e diamantate ed infine
4. invio di prese bioptiche multiple per valutazione istologica a fresco al congelatore a confermare la radicalità della resezione.

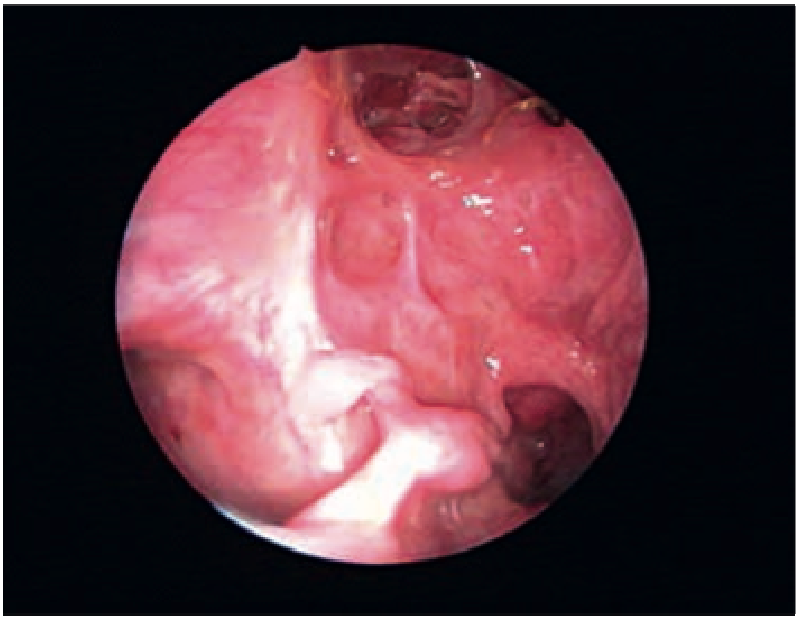


Fig. 6: Immagine endoscopica post-operatoria (procedura endoscopica di tipo II su papilloma invertito naso-sinusale della fossa nasale di destra).

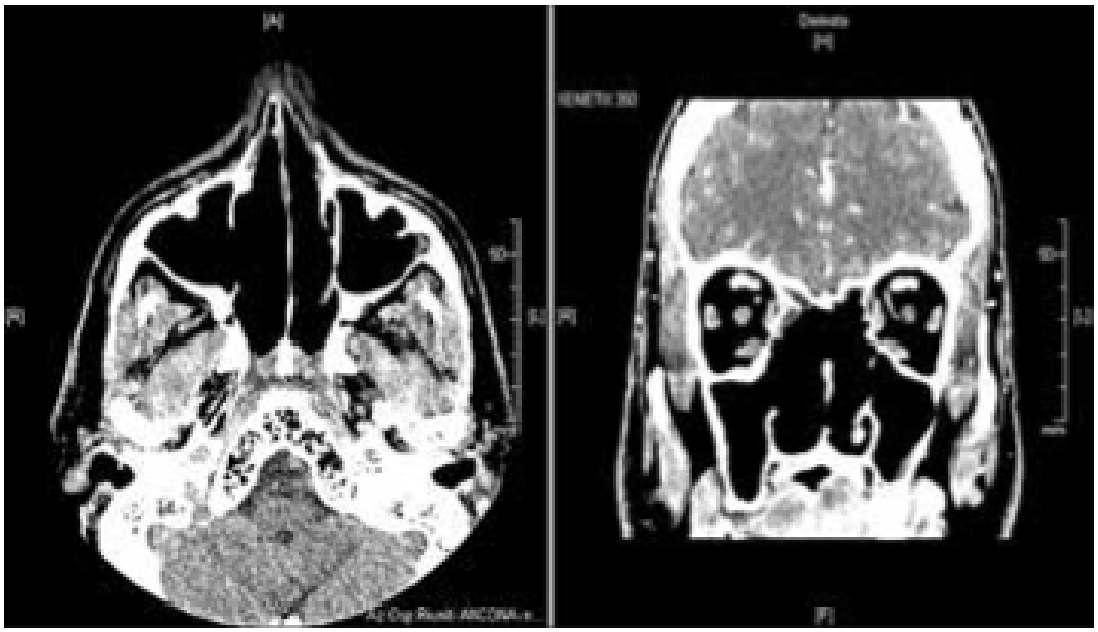


Fig. 7: TC con mdc post-operatoria (procedura endoscopica di tipo II su papilloma invertito naso-sinusale della fossa nasale di destra) in proiezione assiale e coronale.

La rimozione di una certa quantità di mucosa, apparentemente normale, disposta nelle vicinanze della neoplasia, potrebbe essere utile per ridurre il rischio di recidive, anche se, per i papillomi invertiti senza carcinogenesi, è stato dimostrato che l'acquisizione di margini sani al di fuori del campione tumorale non sembra influenzare il controllo della malattia[86].

La resezione dell'area di origine della neoplasia, fresando l'osso, appare essere di massima importanza per ridurre il rischio di recidiva poiché dei foci microscopici di papilloma residuo possono restare intrappolati all'interno dell'osso nel sito di adesione[87].

Landsberg et al. hanno valutato e misurato il punto di attacco/adesione del papilloma invertito e il diametro medio misurato è risultato essere di 8,4±6 mm (range di 3-23 mm)[80].

L'estensione dell'intervento chirurgico varia in base al sito di origine e alla dimensione della lesione.

Di base, possono essere adottati 3 diversi tipi di approcci endonasali[84] (Tab. 4).

1. Etmoidectomia anteriore e posteriore, sfenoidotomia, ampia antrostomia meatale media, turbinectomia media parziale o completa, sinusotomia frontale (tipo I, IIA, IIB o III secondo Draf in base all'estensione della malattia).
2. Etmoidectomia anteriore e posteriore, sfenoidotomia, maxillectomia mediale, turbinectomia media parziale o completa, sinusotomia frontale (tipo I, IIA, IIB o III secondo Draf in base all'estensione della malattia); sezione del dotto nasolacrimale.
3. Etmoidectomia anteriore e posteriore, sfenoidotomia, approccio di Denker con sezione del dotto nasolacrimale, turbinectomia completa inferiore e media, sinusotomia frontale (tipo I, IIA, IIB o III secondo Draf in base all'estensione della malattia).

Tab. 4: Descrizione sintetica delle 3 procedure chirurgiche endoscopiche[84].

Quando il papilloma invertito è limitato al meato medio, all'etmoide anteriore o posteriore o al recesso sfeno-etmoidale, viene effettuata una resezione di tipo 1 comprendente una etmoidectomia anteriore con ampliamento del recesso frontale, una etmoidectomia posteriore, una ampia antrostomia meatale media, una sfenoidotomia e una turbinectomia media parziale o completa (in base all'estensione tumorale). In questa situazione, il campione tumorale è resecato "in blocco" prestando attenzione che la dissezione sia effettuata sul piano sottoperiosteo.

Nei casi in cui la lesione sia estesa dal meato medio al seno mascellare oppure origini dalla parete mascellare mediale, è eseguita una resezione di tipo II. In aggiunta agli step chirurgici della resezione di tipo I, l'operazione include una maxillectomia mediana con o senza sezione del condotto nasolacrimale, in base all'estensione anteriore del tumore.

Per evitare una stenosi post-chirurgica delle vie nasolacrimali, il condotto deve essere sezionato 2-3 mm sotto la valvola di Béraud-Krause con marsupializzazione della porzione superiore.

I papillomi invertiti che originano o coinvolgono la parete del seno mascellare posterolaterale, anteriore o inferiore sono gestiti con una resezione di tipo III, che corrisponde alla tecnica indicata da Brors e Draf come "operazione endonasale di Denker"[88].

Nei pazienti sottoposti a resezioni di tipo II o III, una rimozione della neoplasia in blocco non è possibile a causa della grande estensione della lesione. Pertanto viene effettuato inizialmente un "debulking" della porzione nasale della massa, in modo da concentrarsi in seguito sulle aree più critiche coinvolte dalla lesione, dove la dissezione è sempre eseguita sul piano sottoperiosteo. Successivamente si esegue la fresatura dell'osso sottostante la mucosa patologica per assicurare la radicalità chirurgica.

Le neoplasie che coinvolgono l'antro, il recesso fronto-etmoidale o la porzione mediale del pavimento del seno frontale sono trattate solo endoscopicamente attraverso, rispettivamente, una maxillectomia mediana endoscopica, un approccio Draf II e III o attraverso un approccio endoscopico Lothrop modificato.

Secondo un'analisi della letteratura la percentuale complessiva di complicanze si aggira tra lo 0 e il 20%[75-84].

Le revisioni chirurgiche presentano un più alto tasso di recidiva e l'area di origine del tumore risulta chirurgicamente più impegnativa da individuare.

Un approccio esclusivamente endoscopico può essere controindicato nelle seguenti situazioni:

1. coinvolgimento massivo della mucosa del seno frontale e/o di una cella sopraorbitaria,
2. concomitante presenza di malignità che coinvolge aree critiche e
3. presenza di abbondante tessuto cicatriziale a causa di un precedente intervento chirurgico.

Anche i papillomi invertiti con una estensione intracranica e/o intraorbitaria limitata possono essere trattati con un approccio puramente endoscopico poiché l'esperienza chirurgica acquisita negli ultimi anni ha dimostrato che la plastica durale endoscopica di ampi difetti della base

cranica può essere eseguita con una tecnica multistrato, utilizzando innesti liberi come quelli di fascia lata, cartilagine, osso, mucopericondrio e mucoperiostio[89].

La maggiore criticità nella chirurgia del papilloma invertito è legata alla modalità di interessamento del seno frontale (tra 1% e 16% dei papillomi invertiti originano nel seno frontale con un coinvolgimento bilaterale nel 16,3% e un rischio di recidiva del 22,4%[77]).

L'imaging preoperatorio spesso non è sufficiente nell'identificare il sito di origine e nel chiarire il grado di coinvolgimento del seno frontale. Tale estensione può essere valutata solo intraoperatoriamente e l'approccio chirurgico andrà adeguato di conseguenza ("origin oriented management").

Nel caso in cui il papilloma invertito si estenda semplicemente dall'etmoide fino al recesso frontale e/o al seno frontale senza aderire alla mucosa del seno frontale ("finger like manner"), è effettuata una sinusotomia frontale tipo IIa secondo la classificazione di Draf.

Quando si riscontra un'origine del papilloma invertito a livello del recesso frontale, è utilizzata una sinusotomia frontale di tipo IIb.

In pazienti con lesioni che originano dalla mucosa della parete posteriore del seno frontale, è indicata una sinusotomia frontale tipo III secondo Draf, per aumentare l'esposizione e per raggiungere l'intera parete posteriore con strumenti adeguati[90,91].

Nei casi in cui si riscontri un esteso coinvolgimento della mucosa all'interno di una cella sopraorbitaria, con estensione lateralmente sopra l'orbita, o un massivo interessamento della mucosa del seno frontale, soprattutto in un seno frontale iperpneumatizzato è necessario un approccio combinato endoscopico ed esterno con un flap osteoplastico (OFP), utilizzando un accesso coronale. In questi casi è quasi impossibile la completa visualizzazione del papilloma invertito utilizzando un approccio semplicemente endoscopico e c'è il rischio di rimuovere la lesione senza elevare un flap subperiosteo e senza ottenere margini liberi di sicurezza. Un approccio combinato è quindi indispensabile per ottenere la completa rimozione della mucosa e

per fresare l'osso sottostante negli spazi laterali. In questi casi le valutazioni istologiche intraoperatorie al congelatore sono fortemente raccomandate[78].

CHEMIOTERAPIA

Recentemente alcuni autori[92] hanno descritto l'uso del 5-florouracile (5-FU) nel trattamento post-operatorio dei papillomi invertiti chirurgica- mente più impegnativi. Essi hanno applicato il 5-fluorouracile su una garza di paraffina ("jelonet") e l'hanno lasciata in sede per una settimana prima di toglierla ambulatorialmente.

Il 5-fluorouracile è un agente chemioterapico, analogo della timidina strutturale, che interferisce con la sintesi del DNA, provoca l'apoptosi, ed è quindi utilizzato nel trattamento delle neoplasie maligne epiteliali per la sua azione sulle cellule in proliferazione.

L'applicazione topica del 5-fluorouracile potrebbe trovare impiego nel trattamento post-operatorio nei casi in cui non si è certi che tutta la neoplasia sia stata completamente rimossa o nei casi in cui ci sia stata una rimozione incompleta.[92]

RADIOTERAPIA

La terapia radiante generalmente non è raccomandata per il trattamento dei papillomi invertiti naso-sinusali.

Nei papillomi invertiti con carcinoma squamocellulare la radioterapia è frequentemente utilizzata. La radioterapia post-operatoria (dose compresa tra 45 e 70,4 Gy con una media di 60 Gy) è fortemente raccomandata in tutti i casi, tranne le piccole lesioni maligne nelle quali è stato rimosso un margine sufficiente di mucosa ed osso sano; la radioterapia adiuvante, dunque, non dovrebbe essere impiegata quando sono state identificate solo delle aree microscopiche di carcinoma squamocellulare o di carcinoma in situ[78]. Comunque, a causa della rarità della neoplasia, nessun trial randomizzato sul ruolo della radioterapia in questi casi sarà mai condotto e le raccomandazioni esistenti per l'irradiazione del papilloma invertito con carcinoma squamocellulare sono basate più su dati empirici che scientifici. Infine, dal momento che la probabilità di disseminazione regionale del papilloma invertito con carcinoma squamocellulare è bassa, l'irradiazione elettiva dei linfonodi locoregionali è indicata solo nei pazienti con coinvolgimento esteso del rinofaringe o in quelli con metastasi del collo comprovate.

FOLLOW UP

Attualmente non esistono delle linee guida per il follow-up dei papillomi invertiti o dei tumori benigni naso-sinusali.

La diagnosi precoce è importante non solo per identificare le recidive che potrebbero portare allo sviluppo del carcinoma, ma anche per ridurre il tempo a disposizione del papilloma per un'eventuale trasformazione maligna. Al riguardo sembra ragionevole stabilire delle linee guida simili a quelle utilizzate per in follow-up del carcinoma squamo-cellulare della testa e del collo. In accordo con Lund[93] è utile ricordare che il termine "recidiva" indica, nella maggior parte dei casi, solamente un residuo di malattia (o l'incompleta resezione) ed è direttamente correlata al tipo di approccio chirurgico e alla "cura" con la quale il papilloma invertito è rimosso.

Inoltre resezioni endoscopiche complete con una "cavità post-chirurgica uniforme e senza angoli" facilita il rilievo di recidive durante il follow-up endoscopico postoperatorio[12,76]. Diversi altri fattori aumentano il rischio di recidiva del papilloma invertito: l'esposizione al tabacco, le dimensioni del tumore, l'ipercheratosi, l'iperplasia epiteliale squamosa, l'aumentato numero di mitosi, la bilateralità e l'assenza di polipi infiammatori[94]. L'esposizione al fumo di tabacco sembra aumentare, inoltre, il rischio di trasformazione maligna suggerendo in questi casi un follow-up ancora più stretto[94].

Alcuni autori evidenziano che ad aumentare il rischio di recidive del papilloma invertito sia la sua possibile (ma fino ad ora mai dimostrata) origine multicentrica[95].

La percentuale di recidiva dopo resezione chirurgica varia ampiamente in letteratura (dal 5 al 60% dei casi possono presentare una recidiva entro 5 anni) e il rischio di recidiva complessivo, riportato in una recente metanalisi, è del 22,4%[96]; inoltre una volta che un papilloma invertito è recidivato, la possibilità di una successiva recidiva aumenta fino al 58%[77].

In una review sistematica di 445 casi di papilloma invertito, Cannady et al.[74] hanno descritto una percentuale di recidiva del 3% per le lesioni limitate alla cavità nasale, alla parete mascellare mediale o ai seni etmoidali. Al contrario il tasso di recidiva per i papillomi invertiti che coinvolgono le altre pareti del seno mascellare, il seno frontale ed il seno sfenoidale è del 19,8%. L'incidenza di recidiva dei papillomi invertiti che si estendono oltre i seni paranasali è del 35,3% La letteratura evidenzia che la maggior parte delle recidive si verificano entro i primi 2 anni dopo l'intervento chirurgico, con un rischio del 17% dei casi dopo i 5 anni, e fino al 6% dopo 10 anni[77].

Nella più ampia analisi retrospettiva dei papillomi invertiti naso-sinusali presente in letteratura, Kim et al.[96] hanno suddiviso i pazienti in un gruppo con meno di 3 anni di follow-up e un altro con almeno 3 anni di follow-up. Gli autori hanno riscontrato un maggior numero di recidive nel gruppo di pazienti con un follow-up di almeno 3 anni (rispettivamente 26,1% e 8,5%). Lombardi et al.[78] hanno osservato un tasso di recidiva del 5,7% nella loro serie di 212 pazienti.

Tra l'1% e il 16% dei papillomi invertiti originano nel seno frontale e le forme bilaterali si riscontrano nel 16% dei casi con un rischio complessivo di recidiva del 22,4% (difficoltà tecniche operatorie)[77]. Il papilloma invertito del seno sfenoidale è associato ad un tasso di recidiva post-chirurgico del 14,6%. Fattori di rischio potenziali sono costituiti, in questo caso, dall'adesione della neoplasia sul recesso ottico-carotideo oppure dalla presenza di displasia o carcinoma in situ[97].

Il rischio di recidiva è più alto nei tumori HPV positivi, dopo interventi chirurgici di revisione, nei pazienti con uno stadio di Krouse più alto (15%-50%) e quando il papilloma invertito coinvolge il recesso frontale[75]. La base di impianto del papilloma invertito è meglio identificata durante il primo intervento chirurgico. Negli interventi chirurgici di revisione trovare la base di impianto può essere più difficoltoso a causa della distorsione anatomica, della presenza di residui patologici, della presenza di tessuto cicatriziale e dall'assenza di punti di rifermento ossei[75].

I pazienti con papilloma invertito inoperabile o residuo presentano infine un più alto rischio di trasformazione maligna e/o recidiva (pazienti con patologia persistente dopo il trattamento chirurgico hanno un più alto rischio di trasformazione maligna (11%) se confrontati a quelli con resezioni complete[34].

Attualmente non ci sono fattori o biomarker predittivi di recidiva e/o di malignità e tutti i pazienti devono essere seguiti nel postoperatorio con esami endoscopici periodici longitudinali (ogni 4 mesi durante il 1 anno, ogni 6 mesi per almeno 4 anni, e poi una volta l'anno).

Una valutazione postoperatoria con RMN (Fig. 8) va programmata nel caso sia presente tessuto cicatriziale che ostacoli la corretta valutazione endoscopica endonasale o in caso di localizzazioni impossibili da controllare endoscopicamente come il seno frontale laterale (ogni 6 mesi per i primi 2 anni e poi una vota l'anno per i successivi 3 anni), oppure quando si rilevi la presenza di un carcinoma squamocellulare sincrono all'esame istologico definitivo (ogni 4 mesi per il primo anno, poi ogni 6 mesi per i successivi 5 anni)[78].

Lesperance et al.[98] hanno descritto un periodo medio di follow-up di 63 mesi e Mirza et al.[34] di 52 mesi (range da 6 a 180 mesi), prima che fosse evidenziato un carcinoma squamocellulare metacrono, suggerendo di effettuare un follow-up post-operatorio a vita.

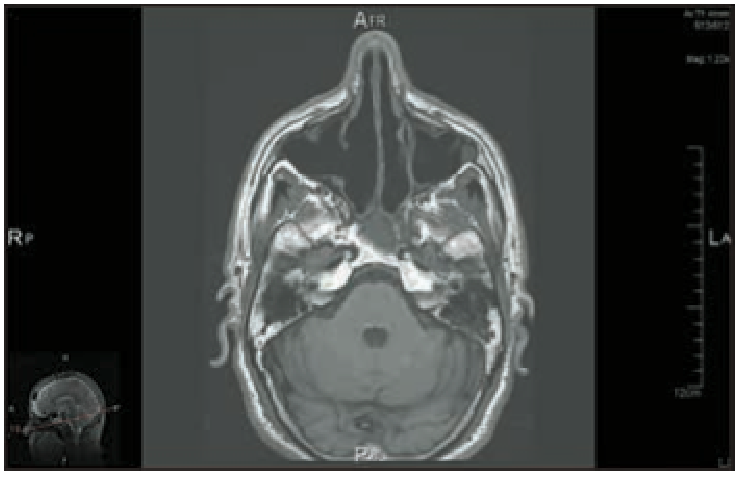


Fig. 8: RMN post-operatoria (procedura endoscopica di tipo II su papilloma invertito naso-sinusale della fossa nasale di destra) in sequenza T2 pesata ed in proiezione assiale.

CAPITOLO II

STUDIO SPERIMENTALE

INTRODUZIONE

Il papilloma invertito naso-sinusale (SNIP) è una neoplasia epiteliale benigna che origina dalla mucosa respiratoria naso-sinusale.

Anche se istologicamente benigno il papilloma invertito naso-sinusale ha un decorso clinico potenzialmente aggressivo data l'elevata incidenza di recidiva e la possibilità di trasformazione maligna in carcinoma squamocellulare naso-sinusale (SNSCC).

L'eziopatogenesi del papilloma invertito naso-sinusale resta ad oggi poco conosciuta.

La ricerca attuale mira all'identificazione delle alterazioni molecolari genetiche ed epigenetiche coinvolte nello sviluppo del SNIP e nella sua trasformazione maligna in SNSCC con l'obiettivo di identificare biomarkers diagnostici e prognostici e specifici target terapeutici.

Nel nostro studio è stata eseguita l'analisi del miRNoma su campioni bioptici di SNIP e SNSCC per delineare il profilo di espressione dei microRNA in tali tessuti patologici ed identificare eventuali microRNA deregolati (sotto-espressi o sovra-espressi rispetto al tessuto sano adiacente).

MicroRNA

I microRNA[99,100] sono una classe di piccole molecole di RNA a singolo filamento lungo circa 20-22 nucleotidi, non codificanti per proteine, riconosciute come componenti cruciali dell'epigenetica.

I microRNA rappresentano una classe di small RNAs unitamente agli Short interfering RNA (siRNA), Piwi RNA (piRNA), Trans-acting siRNA (tasiRNA), Small-scan RNA (scnRNA) e Repeat-associated siRNA (rasiRNA).

I microRNA sono ampiamente presenti in natura e, per la maggior parte, sono ampiamente caratterizzati nelle piante e nei nematodi, dove per la prima volta vennero osservati.

Differiscono per sequenza, quantità, pattern di espressione e localizzazione genomica.

Ad oggi sono stati identificati e validati centinaia di miRNAs umani, più di 1.500 secondo la più recente versione di miRBase sia mediante un approccio sperimentale sia mediante analisi computazionale.

Tutti i miRNAs scoperti vengono puntualmente depositati nel Sanger centre miRBase database[101], un registro dei miRNAs, in cui sono annotate tutte le loro caratteristiche e le informazioni che riguardano la loro genomica, ovvero il modo in cui i loro geni sono organizzati sui cromosomi umani.

Nei vertebrati i miRNAs costituiscono circa l'1% di tutti i geni.

I geni codificanti i miRNAs sono distribuiti su tutti i cromosomi, eccetto il cromosoma Y.

Nel 50% dei casi geni per differenti miRNAs sono localizzati in loci adiacenti, organizzandosi in veri e propri clusters. Ad esempio il cluster costituito dai miRNAs hsa-let-7a-1, hsa-let-7f-1 e hsa-let-7d presente nel cromosoma 9.

La maggior parte dei geni che codificano per i microRNA hanno isoforme multiple (paraloghi) che sono probabilmente il risultato della duplicazione genica.

I geni paraloghi hanno spesso una sequenza identica nella porzione 5' relativa alle posizioni nucleotidiche 2-7.

Dato che questi sei nucleotidi 'seed sequence' sono cruciali per l'appaiamento con l'mRNA bersaglio, si pensa che i geni paraloghi agiscano in maniera ridondante.

In realtà, essendo anche la porzione 3' dei miRNAs importante per l'appaiamento con l'mRNA bersaglio, e poiché questi miRNAs hanno spesso pattern di espressione differenti, membri della famiglia con la stessa 'seed sequence' possono avere ruoli distinti in vivo.

Spesso i cluster di microRNA sono trascritti come singola unità trascrizionale (TU) policistronica; nonostante esistano casi eccezionali nei quali tali microRNA vengono individualmente trascritti da promotori separati.

Alcuni microRNA sono generati da TU non codificanti, mentre altri sono all'interno di TU codificanti proteine.

Approssimativamente il 40% dei loci dei miRNAs sono localizzati in regioni introniche di TU non codificanti, mentre il 10% è situato in regioni esoniche[102] (Fig. 9).

I loci dei miRNAs che si trovano in TU codificanti proteine sono localizzati generalmente in regioni introniche, le quali rappresentano il 40% di tutti i loci dei microRNA.

Alcuni loci di microRNA vengono definiti 'misti', poiché la loro localizzazione è intronica o esonica a seconda del pattern di splicing.

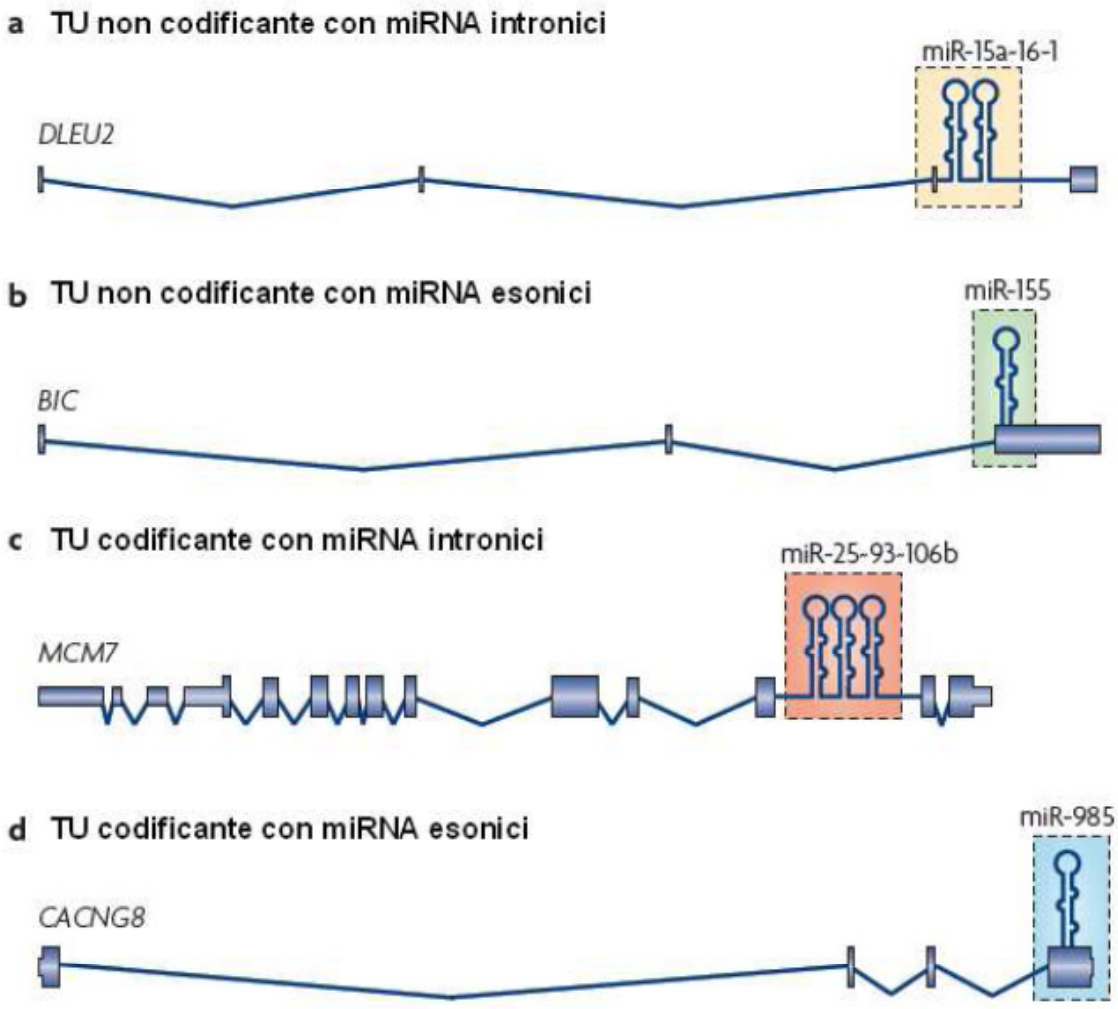

a TU non codificante con miRNA intronici
miR-15a-16-1
DLEU2
b TU non codificante con miRNA esonici
miR-155
BIC
c TU codificante con miRNA intronici
miR-25~93~106b
MCM7
d TU codificante con miRNA esonici
miR-985
CACNG8

Fig. 9

I microRNA vengono codificati sottoforma di lunghi trascritti primari caratterizzati da una complessa struttura a forcina (pri-miRNA) (Fig.10) e sono processati nel nucleo dalla RNasi III[103] Drosha a formare un microRNA precursore (pre-miRNA) della lunghezza di 70-80 nucleotidi[104].

Queste molecole precursori vengono esportate attraverso un meccanismo mediato dall'Esportina5 dal nucleo al citoplasma dove un ulteriore step di maturazione mediato dall'RNasi II Dicer[105]

genera un RNA a doppio filamento (dsRNA) della lunghezza di circa 22 nucleotidi, chiamato dsmiR/miR.

Tale dsRNA viene successivamente legato dalla proteina Argonaute (Ago) ed incorporato nel complesso proteico noto come Complesso che induce il silenziamento di RNA (RISC).

A questo punto, uno dei due filamenti, il filamento guida o miRNA, resta legato ad Argonaute

e costituirà il miRNA maturo, mentre l'altro filamento sarà sottoposto a degradazione da parte di

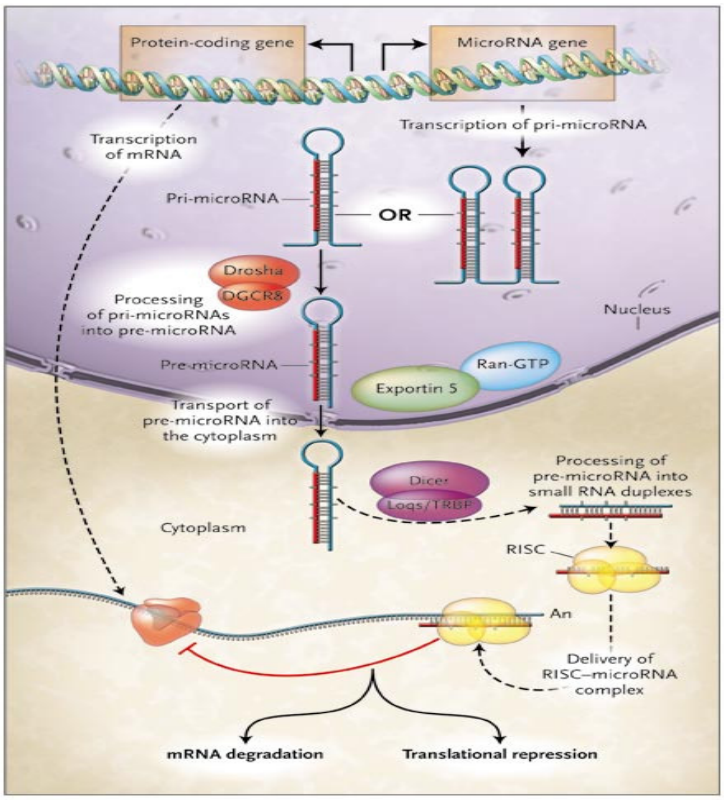


Fig. 10

I microRNA sono componenti cruciali dell'epigenetica: regolano negativamente l'espressione genica silenziando geni target a livello post-trascrizionale, attraverso il legame con siti parzialmente complementari nella 3'-UTR (regioni non trascritte) dei loro mRNA target.

Hanno un ruolo importante nella regolazione dell'espressione di geni implicati nella differenziazione, proliferazione ed apoptosi cellulare, orchestrano eventi che vanno dall'organogenesi all'immunità e sono riconosciuti per essere critici nello sviluppo di molte malattie, incluso il cancro.

È interessante notare che il profilo di espressione globale dei miRNAs nei tessuti normali è diverso da quello nei tessuti tumorali.

Le ultime scoperte, basate sull'espressione dei miRNAs nei tessuti neoplastici e nella controparte tissutale sana, hanno evidenziato che l'espressione dei miRNAs possono distinguere un tessuto neoplastico da quello sano.

Questo è stato evidenziato nel tumore di mammella, polmone, pancreas, fegato e nelle leucemie [106, 107, 108, 109, 110].

Molti di essi sono differentemente espressi nel corso dello sviluppo e del differenziamento e la modulazione specifica di diversi miRNAs è stata di recente associata ad alcune forme tumorali umane[111].

Queste osservazioni hanno portato a postulare che i miRNAs possono essere considerati come una nuova classe di oncogeni o oncosoppressori[112].

I microRNA agiscono da oncogeni silenziando geni oncosoppressori o da oncosoppressori silenziando protooncogeni.

La regolazione dei miRNAs è compromessa nel cancro e diversi studi suggeriscono che questa disregolazione possa essere associata alle caratteristiche del tumore e alla sua prognosi.

Numerosi ed eterogenei miRNAs, sia esosomiali che circolanti, sono stati associati a diverse neoplasie. In campo ORL studi precedenti hanno dimostrato l'espressione di miR-21, miR-34c e

let-7a nel tessuto neoplastico laringeo[113]. Alcuni specifici miRNAs hanno già assunto un significato prognostico nel cancro del polmone e nella leucemia linfatica cronica[114, 115, 116].

È stato evidenziato che una deregolazione d'espressione dei miRNAs nei tumori può risultare da riarrangiamenti cromosomici, come per esempio la delezione che abroga dei proapoptotici miR15/16 nella leucemia linfatica cronica a cellule B (B-LCC)[117]. Questi miRNAs sono localizzati in una regione del cromosoma 13q14 che si trova deleta in circa la metà dei casi di B-CLL e sono soppressi in oltre due terzi dei casi di leucemia.

Anche se le alterazioni nell'espressione dei miRNAs nei carcinomi squamocellulari primitivi sono state recentemente delineate in diversi report, poco si sa riguardo a come queste differenze siano associate alle caratteristiche cliniche e ai fattori di rischio della neoplasia.

Molti microRNA sono coinvolti nei processi fisiologici e patologici dell'angiogenesi e dell'integrità vascolare. La carcinogenesi richiede uno scambio di informazioni attivo tra le cellule tumorali e le cellule stromali per sviluppare un microambiente di supporto e un continuo rimodellamento dei vasi nello stroma.

I microRNA possono avere altresì un grosso potenziale terapeutico per il trattamento di patologie dismetaboliche, ad esempio recentemente è stato dimostrato che la repressione di miR-122 mediante inibitori chimicamente modificati (antagomir) porta ad una duratura correzione in vivo dell'ipercolesterolemia[113].

OBIETTIVO DELLO STUDIO

Valutare il ruolo ed il possibile significato clinico prognostico dell'espressione di specifici microRNA nel papilloma invertito naso-sinusale e nel carcinoma squamocellulare naso-sinusale.

MATERIALI E METODI

Popolazione di studio

Abbiamo effettuato uno studio di coorte retrospettivo su 32 pazienti affetti da papilloma invertito naso-sinusale (SNPI) e 6 pazienti affetti da carcinoma squamocellulare naso-sinusale (SNSCC) sottoposti a trattamento chirurgico primario presso la SOD di Otorinolaringoiatria dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria – Ospedali Riuniti di Ancona e la UOC ORL Area Metropolitana, Ospedale Bellaria, AUSL Bologna nel periodo 2011 – 2018.

Dalle cartelle cliniche dei pazienti sono stati estratti i seguenti dati: età alla diagnosi, sesso, abitudini tabagiche, attività professionale (mansione lavorativa), sede del tumore, stadio (classificazione TNM-AJCC/UICC TNM classification 7th edition 2010), caratteristiche istologiche (grading), sopravvivenza libera da malattia (Deasease Free Survival-DFS) e sopravvivenza complessiva (Overall Survival – OS).

I criteri d'inclusione nello studio prevedevano:

- Disponibilità completa dei dati clinici dei pazienti;
- Disponibilità dei campioni bioptici adeguati alla valutazione;
- Follow-up minimo di 2 anni.

I criteri di esclusione prevedevano:

- Pazienti con pregresse neoplasie maligne e/o trattamenti radio/chemioterapici;
- Pazienti in condizioni cliniche precarie per importanti patologie concomitanti che avevano condizionato l'effettuazione del protocollo terapeutico stabilito.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a terapia chirurgica primaria (approccio endoscopico endonasale con o senza craniectomia transnasale) in base alla estensione locale della neoplasia.
Durante l'intervento chirurgico da ciascun paziente è stato prelevato un campione bioptico di tessuto tumorale e un campione bioptico di tessuto sano adiacente.
Il campione bioptico è stato successivamente immerso in soluzione RNAlater (Ambion) e conservati a -80°C.
Il follow-up dei pazienti è stato effettuato con controlli endoscopici endonasali e di RMN del Massiccio Facciale ogni 6 mesi.
Tutti i pazienti hanno fornito il consenso informato. Lo studio è stato condotto in accordo alla dichiarazione di Helsinki. I campioni sono stati processati secondo le indicazioni del Comitato Etico dell'Ospedale Universitario delle Marche n° 501 DG del 29/09/2011.

Analisi del miRNoma

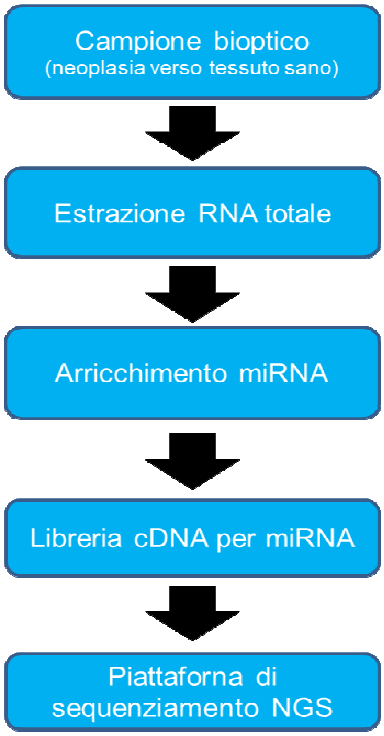
La prima fase dello studio è consistita nell'identificazione dei miRNAs deregolati nel tessuto neoplastico rispetto al tessuto sano. A tale scopo, tutti i miRNAs (miRNoma) sono stati analizzati mediante la tecnologia NGS 'Next Generation Sequencing'.

L'analisi miRNoma è stata eseguita in un sottogruppo di pazienti affetti da SNIP (n=5) e pazienti affetti da SNSCC (n=6). I pazienti SNIP avevano un'età media di 71 ± 15 anni, 4 maschi e 1 femmina, non fumatori, mentre i pazienti SNSCC avevano un'età media di 74 ± 8 anni, di sesso maschile e non fumatori.

Dai campioni bioptici (sano e patologico) dei pazienti selezionati è stato estratto l'RNA totale utilizzando un kit commerciale RNeasy Mini Kit (Qjagen).

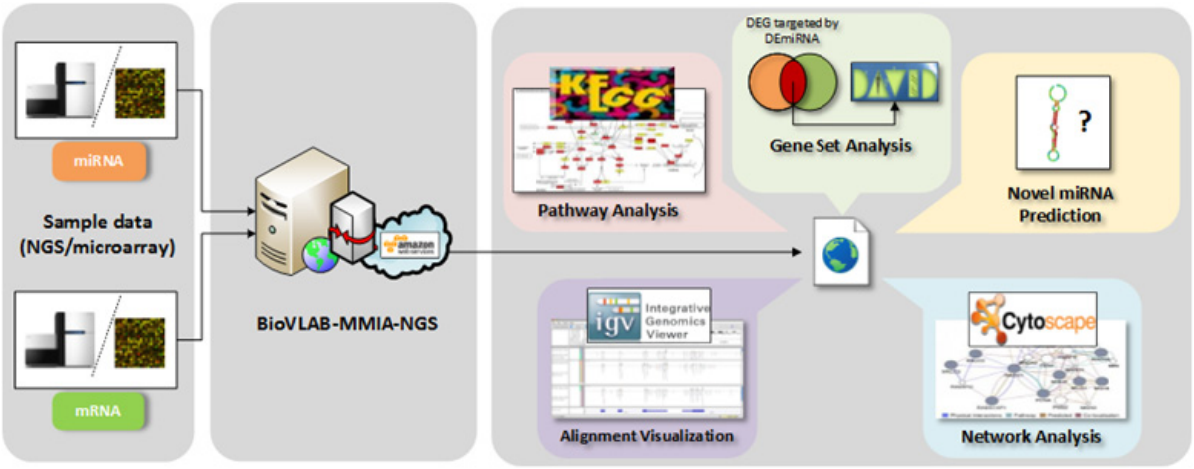
Dopo aver analizzato la purezza e l'integrità dell'RNA totale mediante Qubit Flex Fluorometer (ThermoFisher), i campioni sono stati sequenzianti con tecnologia NGS secondo le fasi illustrate nello Schema 1.

Schema 1: Rappresentazione grafica delle varie fasi per l'analisi miRNoma mediate tecnica NGS



Le librerie sono state preparate utilizzando il kit TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina Inc.) e successivamente sequenziate con un 'sequencer' Illumina NextSeq500 (Illumina Inc.) che generava ~ 22 milioni di letture di estremità accoppiate a 75 bp per campione.

Dopo il controllo di qualità con FastQC (versione 0.11.3) i dati sono stati elaborati usando miRDeep2 (v2.0.0.5) e miRBase (versione 21) come descritto in precedenza (Krauskopf et al., 2015).



I livelli di miRNA recuperati dall'output di miRDeep2 sono stati analizzati utilizzando R (versione 3.2.2).

Per rilevare i livelli differenziali di miRNA tra le diverse condizioni è stato utilizzato il pacchetto DESeq2 (versione 1.8.1).

I risultati sono stati filtrati per i miRNA significativamente alterati applicando un tasso di falsità inferiore al 5%.

Per la quantificazione di isomiR è stato usato Isomirage per mappare tutte le letture su un database isomiR derivato da un miRBase.

Le letture sono state convertite proporzionalmente e per ogni condizione è stato identificato l'isomiR predominante per miRNA.

Le letture rimanenti dal sequenziamento miRDeep2 sono state usate per prevedere nuovi miRNAs.

Dosaggio miRNAs mediante RT-PCR quantitativa

L'RNA totale è stato estratto da campioni di tessuto bioptico fresco (10-100 μg) usando il kit RNeasy (Qiagen) secondo le istruzioni della casa produttrice.

La concentrazione e la purezza dell'RNA sono state determinate allo spettrofotometro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

Il cDNA è stato sintetizzato utilizzando il kit di trascrizione inversa TaqMan®Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (item no. A25576; Life Technologies, Grand Island, NY).

RT-PCR quantitativa (qPCR) è stata eseguita utilizzando il TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) usando il miR-99b come gene normalizzatore 'housekeeping'.

I saggi qPCR sono stati effettuati utilizzando il Mastercycler EP Realplex (Eppendorf) utilizzando le seguenti condizioni: 50°C per 2 minuti, 95°C per 20 s, seguito da 40 cicli di 95°C per 1 secondo e 60°C per 20 secondi, seguito da una sospensione a 4°C.

I dati grezzi sono stati analizzati utilizzando l'impostazione della soglia del ciclo automatico (CT) per assegnare la linea di base e la soglia per la determinazione del CT.

I campioni sono stati analizzati in doppio e i miRNA con un valore CT> 35 sono stati esclusi.

I risultati sono stati espressi come espressione relativa ($2^{-\Delta CT}$) o come Fold-Change ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

Analisi funzionale dei miRNAs

I geni target dei miRNAs significativamente deregolati nel papilloma invertito sono stati predetti usando l'algoritmo DIANA-TOOLS mirpath v.3 (*Vlachos, Ioannis S., Konstantinos Zagganas, Maria D. Paraskevopoulou, Georgios Georgakilas, Dimitra Karagkouni, Thanasis Vergoulis, Theodore Dalamagas, and Artemis G. Hatzigeorgiou. "DIANA-miRPath v3. 0: deciphering microRNA function with experimental support." Nucleic acids research, 2015*).

L'analisi 'gene ontology (GO)' e l'analisi delle vie di segnale sono state effettuate per stabilire le funzioni dei miRNA target.

Sono stati considerati validi i termini GO e le vie di segnale con un $p<0.05$ e un tasso di falsi positivi <0.05.

Analisi Statistica

I risultati sono espressi come media ± deviazione standard o come mediana, quartile e intervallo di confidenza (CI).

Le variabili categoriche sono state riportate come frazioni o percentuale.

I confronti tra i gruppi, sano e patologico, sono stati eseguiti utilizzando il t-test di Student a due code.

La curva ROC (Receiver Operating Characteristic) è stata effettuata per stabilire il valore diagnostico del miRNAs come biomarcatore del papilloma invertito.

Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando SPSS per Windows versione 19.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

RISULTATI

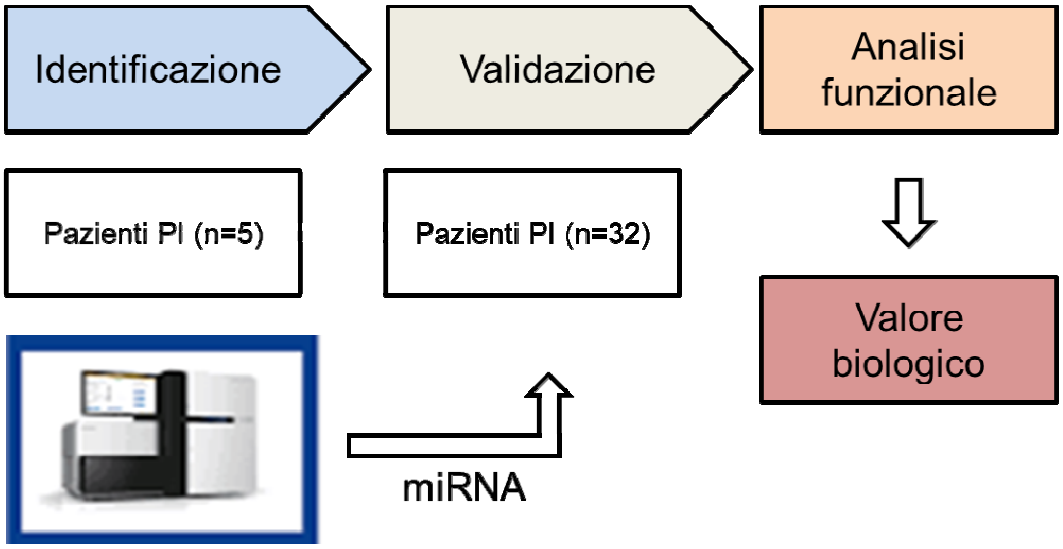
Disegno dello studio

Fase I: Identificazione dei miRNAs che sono deregolati nel tessuto patologico rispetto all'adiacente parte sana sia nel papilloma invertito naso-sinusale sia nel carcinoma squamocellulare naso-sinusale.

Fase II: Validazione dei miRNA selezionati

Fase III: Valore biologico funzionale dei miRNA selezionati

La procedura sperimentale è riassunta nello **Schema 2**:



miRNAs differentemente espressi nel papilloma invertito naso-sinusale (SNIP)

Dall'analisi di sequenziamento dei tessuti di SNIP mediante la metodica NGS sono stati individuati 54 miRNAs deregolati nel tessuto patologico rispetto alla corrispondente parte sana. Come mostrato in Figura 11 la maggior parte dei miRNAs erano sovra-espressi nel tessuto neoplastico (64%) rispetto al tessuto sano.

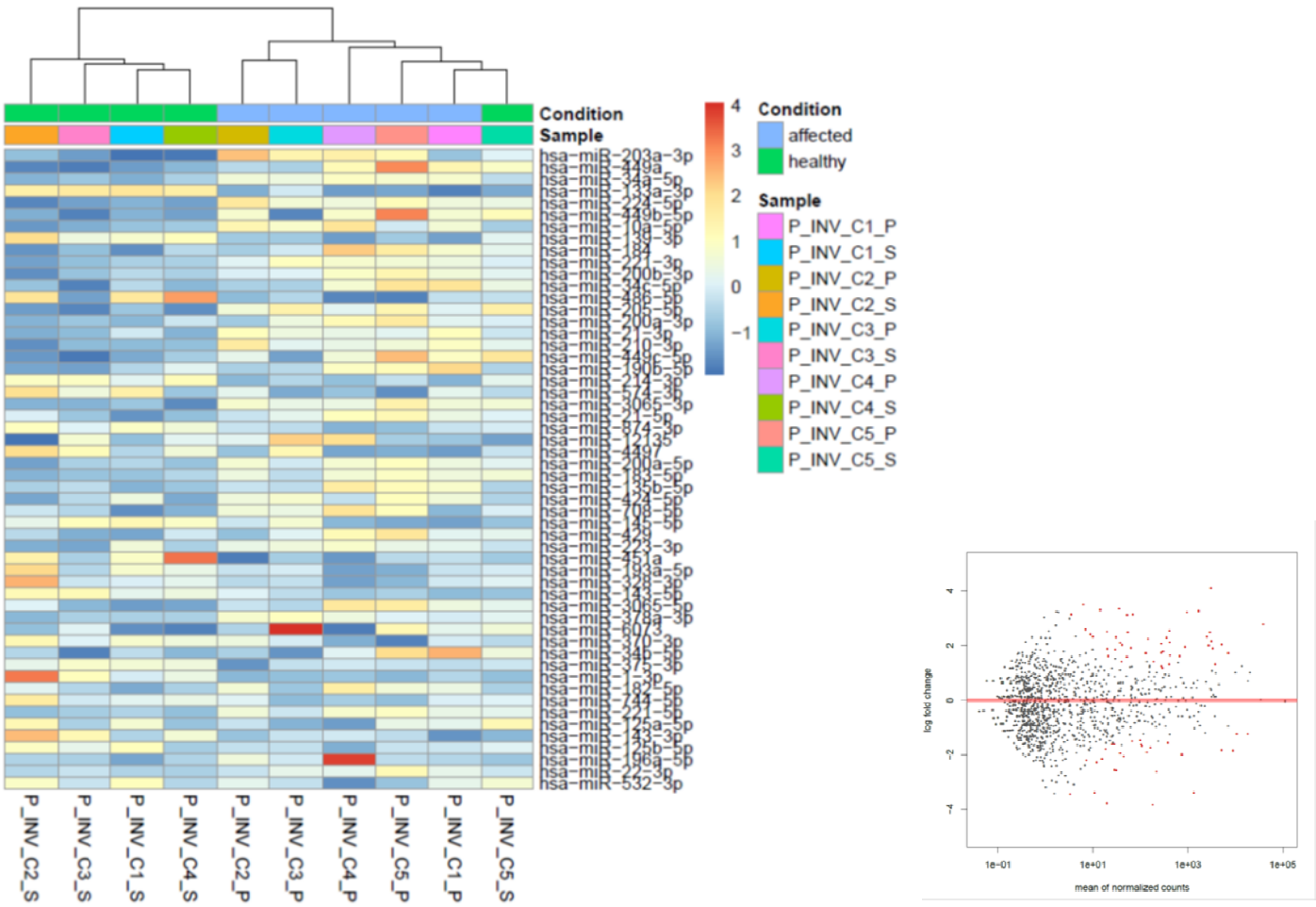


Fig. 11: miRNAs deregolati nel tessuto neoplastico rispetto al tessuto sano di pazienti affetti da papilloma invertito naso-sinusale (SNIP).
Nella Heat Map vengono rappresentati i cambiamenti di espressione di tutti i miRNAs trovati deregolati nei SNIP. Il rosso indica livelli aumentati mentre il blu indica livelli diminuiti.
Nella MAplot sono rappresentati i miRNAs sotto o sovra espressi (inserto di destra).

In base alla significatività (p-value) e alle volte sotto o sovra-espresso nel tessuto patologico rispetto alla parte sana (Fold-Change) è stato identificato il cluster miR-449 (niR-449a, miR-449b, miR-449c) in quanto significativamente sovra-espresso nel tessuto patologico (Fig. 12).

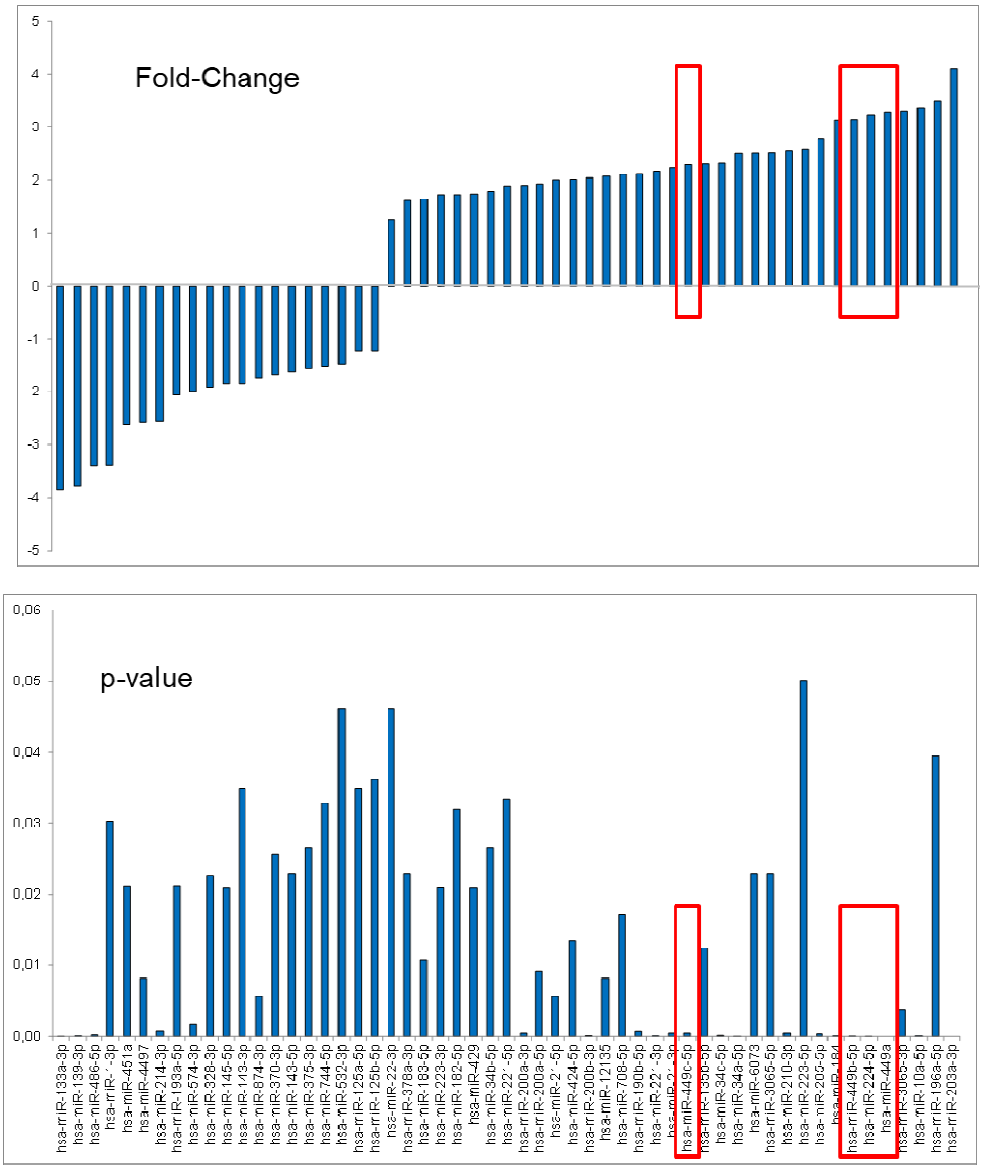
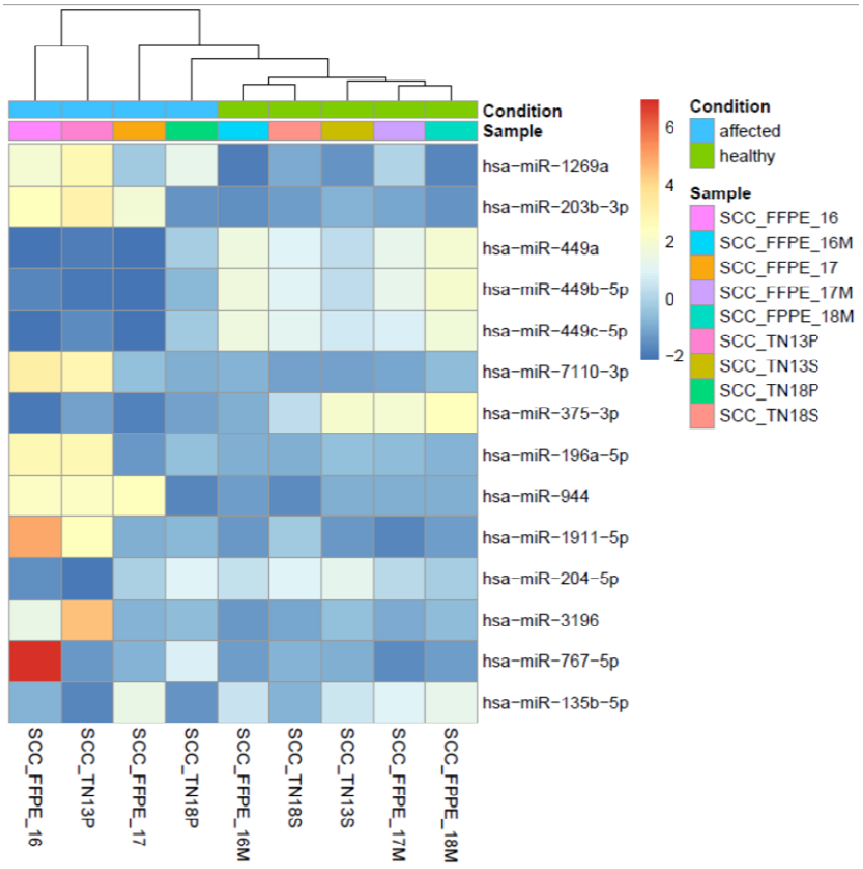


Fig. 12: Distribuzione dei miRNAs sotto e sovra-espressi nel tessuto di PI rispetto al tessuto sano visualizzati come volte di espressione (Fold-Change) e significatività (p-value). I miRNAs con più bassi valori di 'p' sono più statisticamente significativi ($p<0.05$).

miRNAs differentemente espressi nel carcinoma squamocellulare naso-sinusale (SNSCC)

Il papilloma invertito naso-sinusale (SNIP) è una neoplasia epiteliale benigna che origina dalla mucosa respiratoria naso-sinusale. Anche se istologicamente benigno il papilloma invertito naso-sinusale ha un decorso clinico potenzialmente aggressivo, in ragione dell'alta incidenza di recidiva e della possibilità di trasformazione maligna in carcinoma squamocellulare (SNSCC). Pertanto, allo scopo di identificare i miRNAs coinvolti nel processo di trasformazione maligna, l'analisi del miRNoma è stata effettuata anche in pazienti affetti da carcinoma squamocellulare naso-sinusale. Contrariamente a quanto osservato nel PI, il cluster miR-449 è risultato significativamente sotto-espresso nel tessuto patologico rispetto a quello sano (Fig. 13 e Fig. 14).



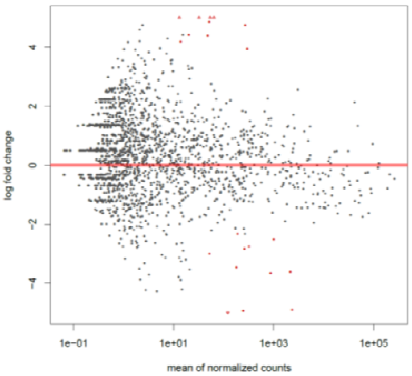


Fig. 13: miRNA deregolati nel tessuto neoplastico rispetto al tessuto sano di pazienti affetti da carcinoma squamocellulare naso-sinusale (SNSCC). Nella Heat Map vengono rappresentati i cambiamenti di espressione di tutti i miRNA trovati deregolati nel SCC. Il rosso indica livelli aumentati mentre il blu indica livelli diminuiti. Nella MAplot sono rappresentati i miRNAs sotto o sovra espressi (inserto di destra).

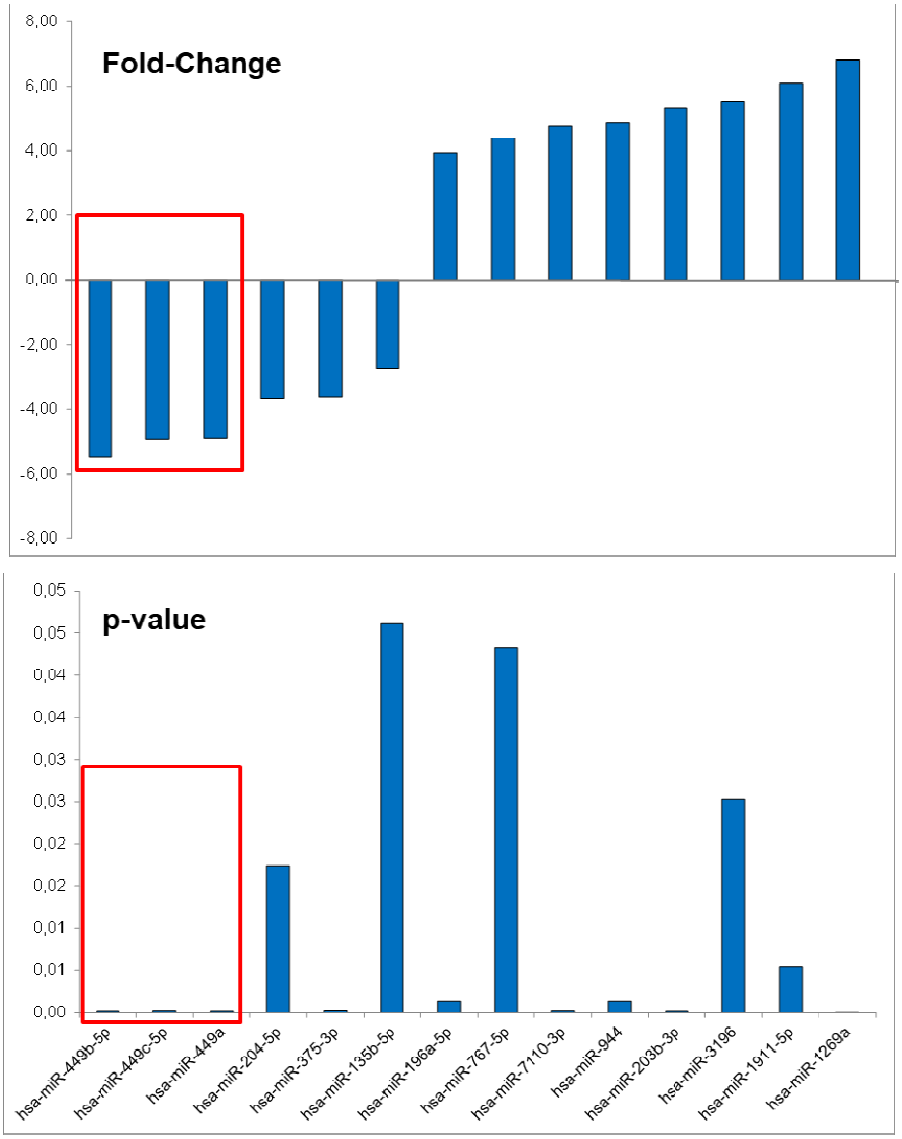


Fig. 14: Distribuzione dei miRNAs sotto e sovra-espressi nel tessuto SCC rispetto al tessuto sano visualizzati come volte di espressione (Fold-Change) e significatività (p-value). I miRNAs con più bassi valori di 'p' sono più statisticamente significativi ($p<0.05$).

miRNAs differentemente espressi nel PI rispetto a SCC

Comparando il tessuto SNIP con il tessuto tumorale SNSCC si osservava che circa 110 miRNAs erano differentemente espressi nel SNPI rispetto a SNSCC, tra questi il cluster miR-449 risultava essere significativamente sovra-espresso nel SNPI rispetto a SNSCC (Fig. 15).

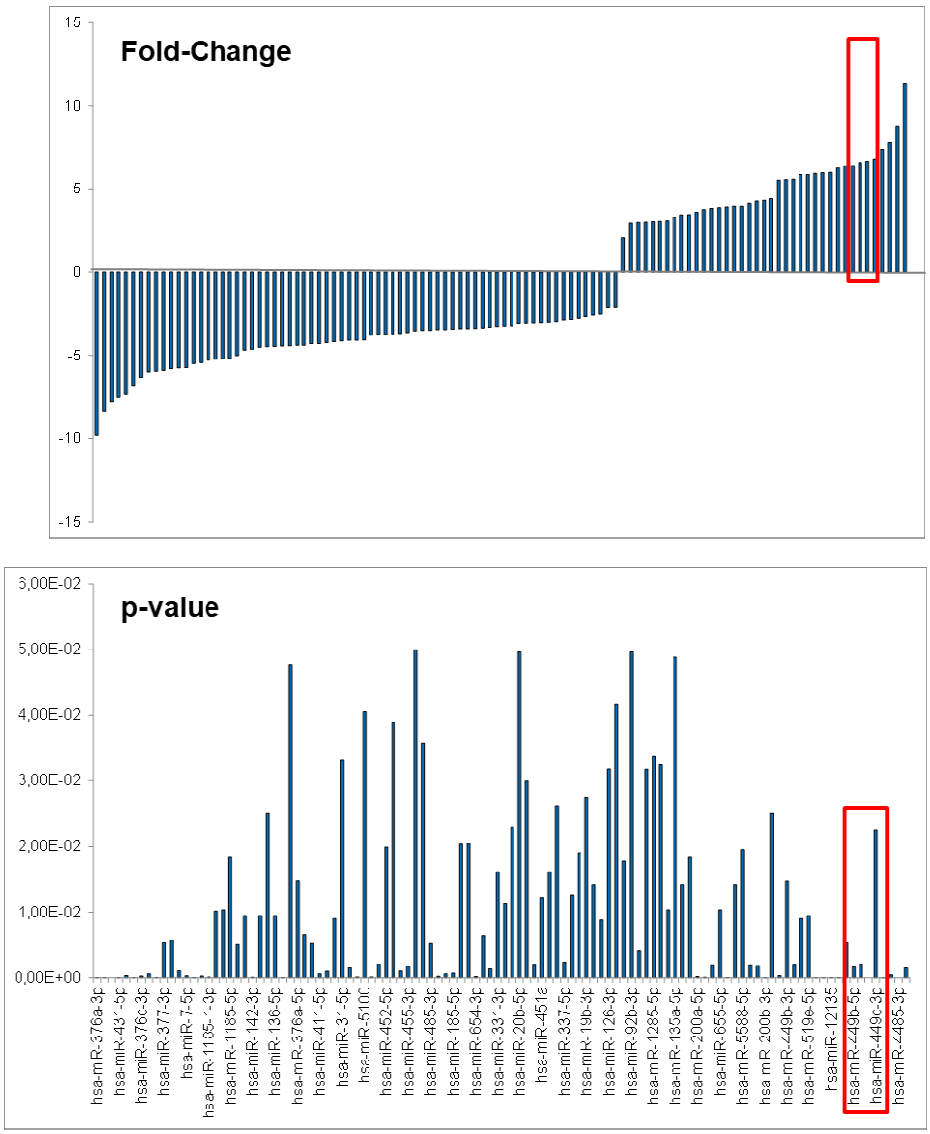


Fig. 15: Distribuzione dei miRNAs sotto e sovra-espressi nel SNPI rispetto al SNSCC visualizzati come volte di espressione (Fold-Change) e significatività (p-value). I miRNAs con più bassi valori di 'p' sono più statisticamente significativi ($p<0.05$).

Validazione del miR-449

Il miR-449a identificato come un miRNA all'interno di un cluster che significativamente variava tra SNIP e SNSCC, è stato successivamente validato in una popolazione più ampia di pazienti affetti da papilloma invertito.

La popolazione di studio era composta da 32 pazienti di età media di 62 ± 16 anni, di sesso maschile nel 69% e non fumatori nel 46%. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un trattamento chirurgico endoscopico endonasale. Una piccola percentuale della popolazione arruolata ha presentato recidiva (9%) e solo un caso ha sviluppato un carcinoma squamocellulare naso-sinusale.

Le caratteristiche demografiche e clinico-patologiche sono riportate in Tab. 5.

Tab. 5: Caratteristiche demografiche e clinico-patologiche della popolazione

	Popolazione di studio (n=32)
Età (anni)	62 ±16
Sesso M/F (n°)	
Maschi	22 (69%)
Femmine	10 (31%)
Fumo (n°)	
Fumatore	12 (38%)
no fumatore	15 (46%)
ex-fumatore	5 (15%)
Sede	
Fossa nasale	12 (38%)
Etmoide	18 (56%)
Seno mascellare	2 (6%)
Chirurgia	
Fossa nasale	8 (25%)
Etmoide	20 (63%)
Seno mascellare	4 (12%)
Recidiva	
No	28 (88%)
Si	3 (9%)
SCC	1 (3%)
Mansione	
Operaio	6 (19%)
Impiegato	11 (34%)
Pensionato	12 (38%)
Disoccupato	3 (9%)

Come riportato in Figura 16 si osserva che, come precedentemente evidenziato dall'analisi del miRNoma, il miR-449a, era significativamente sovra-espresso nel tessuto patologico ed era in grado di differenziare il tessuto sano con una AUC (area under curve) di 0.864 [0.721-1.000], p=0.002.

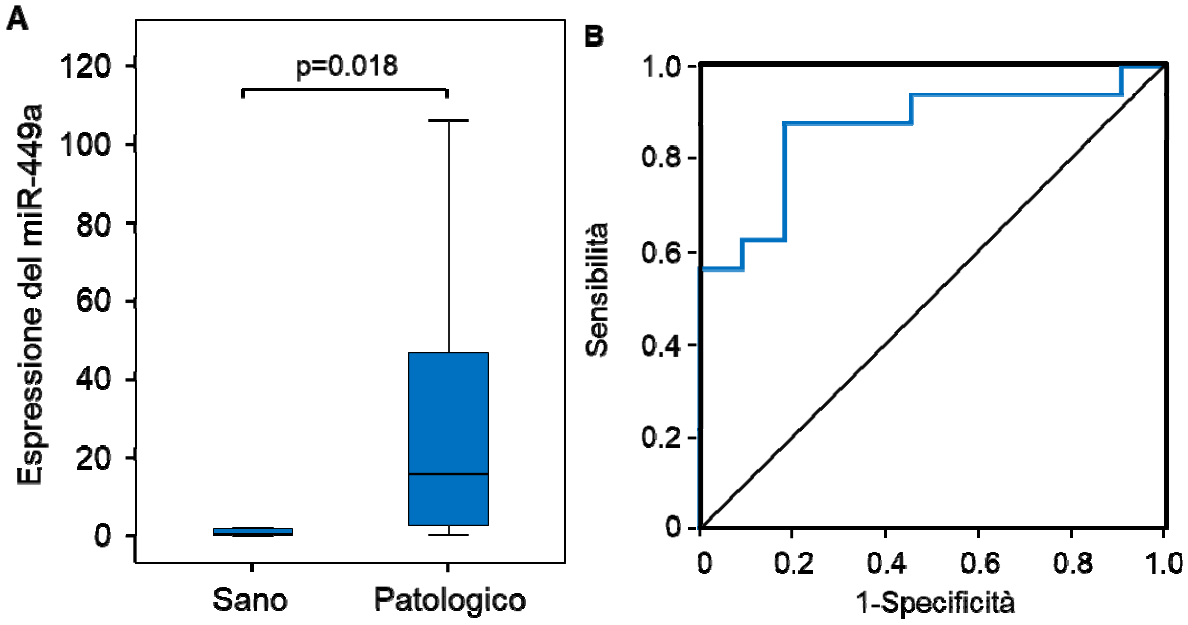


Fig. 16: Distribuzione dell'espressione del miR-449a e valore diagnostico nel PI. L'espressione del miR-449a è stato valutato nel tessuto patologico e sano di pazienti affetti da PI (A). La curva ROC è stata effettuata per differenziare il tessuto patologico da quello sano. Le differenze tra i gruppi sono state analizzate con il t-test di student e considerate statisticamente significative quelle con valori di $p < 0.05$.

Valore funzionale e biologico dei miRNAs selezionati

Allo scopo di valutare le funzioni biologiche dei miRNAs deregolati nel PI, è stata eseguita l'analisi Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG analysis) e l'analisi gene ontology (GO).

Utilizzando un algoritmo (DIANA TOOLS) si sono evidenziate numerose vie di segnale e metaboliche coinvolte nella patologia.

In particolare, il metabolismo e la biosintesi degli acidi grassi sono quelle significativamente deregolate (Fig. 17A).

Tali vie sono regolate dal miR-449a identificato quale miRNAs significativamente coinvolto nella transizione tra PI e SNSCC (Fig. 17B).

Il miR-449a regola numerose proteine target coinvolte in diversi processi biologici (Fig. 17C).

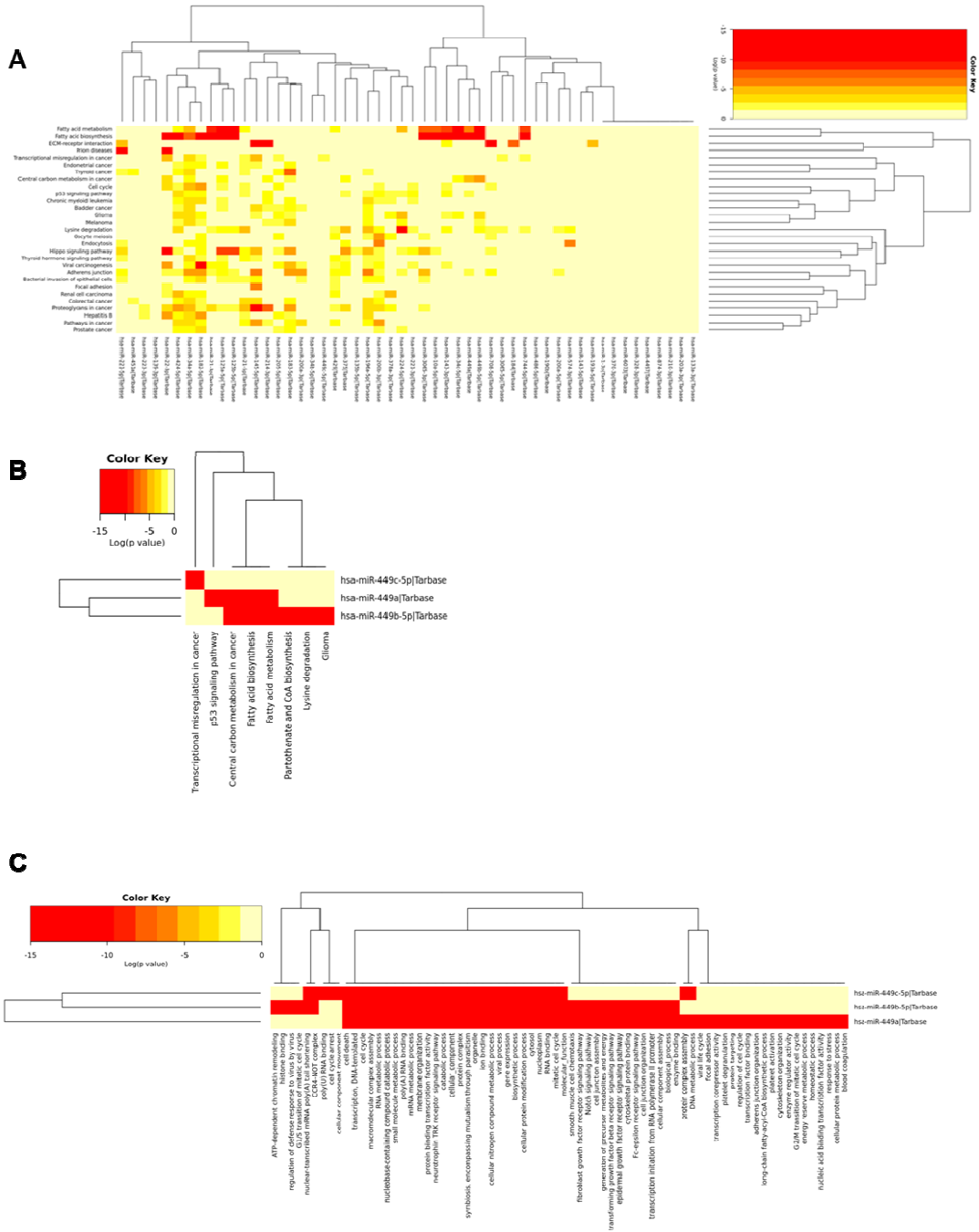


Fig. 17: Analisi funzionale dei miRNA differentemente espressi nel PI.

Analisi KEGG di 54 miRNA deregolati nel tessuto patologico (A). Valutazione funzionale del miR-449a mediante analisi KEGG (B) e GO (C). La significatività delle analisi è stata considerata con $p<0.05$.

DISCUSSIONE

Il papilloma invertito naso-sinusale (SNIP), anche se neoplasia istologicamente benigna, presenta un decorso clinico potenzialmente aggressivo data l'elevata incidenza di recidiva e la possibilità di trasformazione maligna in carcinoma squamocellulare naso-sinusale (SNSCC).

Il rischio di recidiva e di trasformazione maligna dei pazienti con papilloma invertito naso-sinusale, pur con il miglioramento delle tecniche chirurgiche oggi a disposizione, è rimasto sostanzialmente invariato negli ultimi anni.

L'eziopatogenesi del papilloma invertito naso-sinusale resta ad oggi poco conosciuta; probabilmente si tratta di una patologia multifattoriale in cui diversi fattori, tra cui meccanismi molecolari genetici e/o epigenetici oltre l'infezione da HPV, intervengono nello sviluppo e nella progressione neoplastica.

Numerosi studi hanno dimostrato che le alterazioni epigenetiche giocano un ruolo nella carcinogenesi del carcinoma squamocellulare della testa e del collo.

Nel nostro lavoro, per ottenere ulteriori informazioni sul fenotipo e sui possibili meccanismi molecolari nel SNIP, abbiamo utilizzato la tecnologia NGS per la valutazione globale di tutti i miRNAs conosciuti e non (miRNoma) in campioni tumorali di pazienti affetti da SNIP e SNSCC. Dall'analisi del miRNoma è stato identificato un profilo di miRNAs costituzionalmente deregolati nel SNIP e nel SNSCC e biologicamente rilevanti nel differenziare il tessuto sano da quello neoplastico. Tra questi, in base alla significatività (p-value) e al Fold-Change, è stato selezionato il cluster miR-449 (miR-449a, miR-449b, miR-449c). Il miR-449a è stato successivamente validato sulla popolazione di pazienti con papilloma invertito naso-sinusale mediante RT-PCR quantitativa (qPCR).

I risultati del nostro studio evidenziano che nel papilloma invertito naso-sinusale il cluster miR-449 (miR-449a, miR-449b, miR-449c) risulta significativamente sovra-espresso nel tessuto patologico rispetto al tessuto sano ($p < 0.05$), mentre nel carcinoma squamocellulare naso-

sinusale, al contrario, il cluster miR-449 (miR-449a, miR-449b, miR-449c) risulta significativamente sotto-espresso nel tessuto patologico rispetto a quello sano ($p<0.05$).

Inoltre sulla base della nostra analisi funzionale mediante algoritmi, il miR-449 è risultato coinvolto nella regolazione delle vie del metabolismo e della biosintesi degli acidi grassi.

Dalla letteratura scientifica, a conferma dei nostri risultati, emergono alcune importanti conoscenze sulla caratterizzazione del cluster miR-449 (miR-449a, miR-449b, miR-449c).

Il cluster miR-449 ha delle similitudini in sequenza con la famiglia del miR-34 per cui sono classificati come un'unica famiglia di miRNAs (famiglia miR-34/miR-449) composta da sei miRNAs omologhi in tre loci genomici.

La famiglia miR-34/miR-449 è coinvolta nella differenziazione degli epiteli ciliati delle vie aeree superiori che rappresentano la prima linea di difesa nel tratto respiratorio contro gli agenti tossici[118].

I miR-34 e miR-449 si accumulano nelle cellule multi-ciliate dell'epitelio della mucosa nasale[118] e l'espressione dominante di questi miRNAs negli epiteli multiciliati suggerisce un significato funzionale nella ciliogenesi.

I miR-34/449 sembrano promuovere l'assemblaggio di una rete apicale di actina necessaria per il corretto ancoraggio dei corpi basali ed elongazione delle ciglia[119].

È stato dimostrato che sia nel topo che nello Xenopus le cellule multiciliate carenti di miR-34/449 (MCC) mostrano una riduzione significativa della lunghezza e del numero delle ciglia, a causa della maturazione difettosa del corpo basale e dell'aggancio apicale.

L'effetto di miR-34/449 sulla ciliogenesi è stato mediato, almeno in parte, dalla repressione post-trascrizionale di Cp110, un complesso di cilia che sopprime le proteine centriolari[120].

L'identificazione dei target miR-34/449 relativi a percorsi GTPase di piccole dimensioni hanno portato a caratterizzare R-Ras come regolatore chiave di questo processo.

Si propone anche un ruolo di questi miRNA nella rilocalizzazione della proteina A legante l'actina[121].

Inoltre i miR-449 sono potenti induttori di morte cellulare, arresto del ciclo cellulare e/o differenziazione cellulare; inducono apoptosi mediante attivazione TGF-β, NOTCH, NFkB, retinoblastoma-E2F, MAPK, WNT-β-catenina[122]; sono coinvolti nell'inibizione della crescita tumorale, invasione, metastasi per cui potrebbero contribuire alla soppressione del tumore.

In numerose forme tumorali miR-34 e miR-449 sono stati trovati sotto-espressi, come nel tumore polmonare[123], colon-rettale[124], gastrico[125], della cervice uterina[126], prostatico[127].

Una bassa espressione di miR-449a e miR-34, anche se ai limiti della significatività statistica, è stata trovata nel tumore ITAC rispetto alla corrispondente parte sana.

Contrariamente, il miR-449a è stato trovato sovra-espresso nel tessuto mammario maligno. La sua espressione era significativamente associata con una maggiore incidenza di recidiva del paziente, riduzione della sopravvivenza globale (OS) e riduzione della sopravvivenza libera da malattia[128].

CONCLUSIONI

Il nostro studio fornisce la prima evidenza di una iperespressione del cluster miR-449 (miR-449a, miR-449b, miR-449c) nel papilloma invertito naso-sinusale e di una ipoespressione del cluster miR-449 (miR-449a, miR-449b, miR-449c) nel carcinoma squamocellulare naso-sinusale, suggerendo che la mutazione del cluster miR-449 (miR-449a, miR-449b, miR-449c) in combinazione con ulteriori eventi genetici ed epigenetici potrebbe svolgere un ruolo significativo nella patogenesi del SNIP e nella sua trasformazione neoplastica maligna in SNSCC.

Il nostro studio preliminare effettuato su una coorte ridotta di pazienti dovrà necessariamente essere esteso ad un numero maggiore di pazienti e i nostri risultati dovranno essere confermati da studi multicentrici prospettici e randomizzati più ampi.

BIBLIOGRAFIA

1. Batsakis JG, Suarez P. Schneiderian papillomas and carcinomas: a review. Adv Anat Pathol. 2001;8:53-64.
2. Ward N. A mirror of the practice of medicine and surgery in the hospitals of London. London Hosp Lancet. 1854;2:480–482.
3. Kramer R, Som ML. True papilloma of the nasal cavity. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1935;22:22-25.
4. Ringertz N. Pathology of malignant tumors arising in the nasal and paranasal cavities and maxilla. Acta Otolaryngol (Stockh). 1938;27(suppl): 31–42.
5. Shanmugaratnam K, Sobin LH. The World Health Organization histological classification of tumours of the upper respiratory tract and ear. A commentary on the second edition. Cancer. 1993;71:2689–2697.
6. Bawa R, Allen GC, and Ramadan HH. Cylindrical cell papilloma of the nasal septum. Ear Nose Throat J. 1995;74:179–181.
7. Barnes L, and Bedetti C. Oncocytic Schneiderian papilloma: A reappraisal of cylindrical cell papilloma of the sinonasal tract. Hum Pathol. 1984;15:344–351.
8. Buchwald C, Franzmann MB, Tos S. Sinonasal papillomas: a report of 82 cases in Copenhagen Country, including a longitudinal epidemiological and clinical study. Laryngoscope. 1995;105:72-79.
9. Myers EN, Fernau JL, Johnson JT, Tabet JC, Barne EL. Management of inverted papilloma. Laryngoscope. 1990;100:481-490.
10. Wood JW, and Casiano RR. Inverted papillomas and benign non neoplastic lesions of the nasal cavity. Am J Rhinol Allergy. 2012;26:157–163.
11. Cooter MS, Charlton SA, Lafreniere D, Spiro J. Endoscopic management of an inverted nasal papilloma in a child. Otolaryngol Head Nec Surg. 1998;118:876-878.

12. Anari S, Carrie S. Sinonasal inverted papilloma: Narrative review. J Laryngol Otol. 2010;124:705 –715.
13. Maroldi R, Farina D, Palvarini L, Lombardi D, Tomenzoli D, Nicolai P. Magnetic resonance imaging findings of inverted papilloma: differential diagnosis with malignant sinonasal tumors. Am J Rhinol. 2004;18:305–310.
14. Phillips PP, Gustafson RO, Facer GW. The clinical behavior of inverting papilloma of the nose and paranasal sinuses: report of 112 cases and review of the leterature. Laryngoscope. 1990;100:463-469.
15. Chiu AG, Jackman AH, Antunes MB, Feldman MD, Palmer JN. Palmer. Radiographic and Histologic Analysis of the Bone Underlying Inverted Papillomas Laryngoscope. 2006;116:1617-20.
16. Katori H, Nozawa A, Tsukuda M. Histopathological parameters of recurrence and malignant transformation in sinonasal inverted papilloma. Acta Otolaryngol. 2006;126:214–218.
17. Deitmer T, Wiener C. Is there an occupational etiology of inverted papilloma of the nose and sinuses. Acta Otolaryngol (Stockh). 1996;116:762–765.
18. D'Errico A, Zajacova J, Cacciatore A, Buratti A, Zanelli R, Alfonzo S, Beatrice F. Occupational risk factors for sinonasal inverted papilloma: a case-control study. Occup Environ Med. 2013;70(10):703-708.
19. Syrjanen S, Happonen RP, Virolainen E, Siivonen L, Syrjanen K. Detection of human papillomavirus (HPV) structural antigens and DNA types in inverted papillomas and squamous cell carcinomas of the nasal cavities and paranasal sinuses. Acta Otolar- yngol. 1987;104:334–341.
20. Lawson W, Schlecht NF, Brandwein-Gensler M. The role of the human papillomavi- rus in the pathogenesis of Schneiderian Inverted papillomas: an analytic overview of the evidence. Head Neck Pathol. 2008;2:49–59.

21. Beck JC, McClatchey KD, Lesperance MM, Esclamado RM, Carey TE, Bradford CR. Presence of human papillomavirus predicts recurrence of inverted papilloma. Otolaryngol Head Neck Surg. 1995;113:49–55. 5.
22. Beck JC, McClatchey KD, Lesperance MM, Esclamado RM, Carey TE, Bradford CR. Human papillomavirus types important in progression of inverted papilloma. Otolaryngol Head Neck Surg. 1995;113:558–63.
23. Altavilla G, Staffieri A, Busatto G, Canesso A, Giacomelli L, Marioni G. Expres- sion of p53, p16INK4A, pRb, p21WAF1/CIP1, p27KIP1, cyclin D1, Ki-67 and HPV DNA in sinonasal endophytic Schneiderian (inverted) papilloma. Acta Otolaryngol. 2009;129(11):1242-1249.
24. Syrjänen K, Syrjänen S. Detection of human papillomavirus in sinonasal papillomas: systemic review and meta-analysis. Laryngoscope. 2013;123:181–92.
25. Scheel A, Lin GC, McHugh JB, Komarck CM, Walline HM, Prine ME, Zacharek MA, Carey TE. Human papillomavirus infection and biomarkers in sinonasal inverted papillomas: clinical significance and molecular mechanisms. Int Forum Allergy Rhinol. 2015;5(8):701-707.
26. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature. 1993;366:704–7.
27. Chung CH, Gillison ML. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. Clin Cancer Res. 2009;15:6758–62.
28. Lin GC, Scheel A, Akkina S, Chinn S, Graham M, Komarck C, et al. MDP16, EGFR, Cyclin D1, and p53 staining patterns for inverted papilloma. Int ForumAllergy Rhinol. 2013;3:885–9.
29. Sham CL, To KF, Chan PK, Lee DL, Tong MC, van Hasselt CA. Prevalence of human papillomavirus, Epstein-Barr virus, p21, and p53 expression in sinonasal inverted

papilloma, nasal polyp, and hypertrophied turbinate in Hong Kong patients. Head & Neck. 2012;4:520-533.

30. Jenko K, Kocjan B, Zidar N, et al. In inverted papillomas HPV more likely represents incidental colonization than an etiological factor. Virchows Arch. 2011;459:529–38.
31. Govindaraj S, Wang H. Does human papilloma virus paly a role in sinonasal inverted papilloma? Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2014;22(1):47-51.
32. Cheung FMF, Lau TWS, Cheung LKN, Li ASM, Chow SK, Lo AWI. Schneiderian papillomas and carcinomas: a retrospective study with special reference to p53 and p16 tumor suppressor gene expression and association with HPV. Ear Nose Throat J. 2010;89:E5–E12.
33. Choi JW, Kim SG, Kim YM, et a. Clinical and histologic features of inverted papillomaassociated malignancy. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2012; 269:2349-2354.
34. Mirza S, Bradley PJ, Acharya A, et al. Sinonasal inverted papillomas: recurrence, and synchronous and metachronous malignancy. J Laryngol Otol. 2007;121:857-864.
35. Nudell J, Chiosea S, Thompson LD. Carcinoma Ex-Schneiderian Papilloma (Malig- nant Transformation): a clinicopathologic and immunophenotypic study of 20 cases combined with a comprehensive review of the literature. Head and Neck Pathol. 2014;8:269–286.
36. Von Buchwald C, Bradley PJ. Risks of malignancy in inverted papilloma of the nose and paranasal sinuses. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2007;15:95-98.
37. Yoon BN, Chon KM, Hong SL, Lee JH, Kim JY, Cho KS, Roh HJ. Inflammation and apoptosis in malignant transformation of sinonasal inverted papilloma: the role of the bridge molecules, cyclooxygenase-2, and nuclear factor B. American Journal of Otolaryngology–Head and Neck Medicine and Surgery. 2103;34:22–30.
38. Lee GH, Yoon YH, Kim YM, Yeo MK, Liang ZL, Kim JM, Rha KS. Pattern of expression of cyclooxygenase-2 in malignant transformation of sinonasal inverted papil- loma.

American Journal of Otolaryngology–Head and Neck Medicine and Surgery. 2012;33:585–589.

39. Suh JD, Palma-Diaz F, Bhuta S, Wang MB. COX-(2) overexpression in sinonasal inverted papilloma. Int Forum Allergy Rhinol. 2013;3(12):997-1000.
40. Kim SG, Lee OY, Choi JW, Park YH, Kim YM, Yeo MK, Kim JM, Rha KS. Pattern of expression of cell cycle-related protens in malignant trasformation of sinonasal inverted papilloma. Am J Rhinol Allergy. 2011;25(2):75-81.
41. Katori H, Nozawat A, Tsukuda M. Relationship between p21 and p53 expression, human papilloma virus infection and malignant transformation in sinonasal-inverted papilloma. Clin Oncol (R Coll Radiol). 2006;18(4):300–305.
42. Tsou YA, Huang HJ, Wang TC, Tai CJ, Chen CM, Chen CY. Evaluation of correla- tion of cell cycle proteins and Ki-67 interaction in paranasal sinus inverted papilloma prognosis and squamous cell carcinoma transformation. BioMed Research International. 2014;1:1-16.
43. Stasikowska-Kanicka O, Wagrowska-Danilewicz M, Danilewicz M. Immunohistochemical study on survivin in sinonasal tumors and its relationship with the immunoexpression of Ki67 and Bcl-2. Folia Histochem Cytobiol. 2013;51(3):225-231.
44. Matousek P, Zelenık K, Safarcık K, Cabalova L, Komınek P. Squamous cell carci- noma antigen as a marker of sinonasal inverted papilloma. Eur Arch Otorhinolaryn- gol. 2014; 271:535–538.
45. SuminamiY,NagashimaS,VujanovicNL,etal.Inhibitionofapoptosisinhumantumour cells by tumour associated serpin. SCC antigen. Br J Cancer. 2000;82:981–989.
46. Yasumatsu R, Nakashima T, Kuratomi Y, et al. Serum squamous cell carcinoma antigen is a useful biologic marker in patients with inverted papillomas of the sinonasal tract. Cancer. 2002;1:152–158.

47. Yamashita Y, Uehara T, Hasegawa M, Deng Z, Matayoshi S, Kiyuna A, Kondo S, Maeda H, Ganaha A, Suzuki M.. Squamous cell carcinoma antigen as a diagnos- tic marker of nasal inverted papilloma. American Journal of Rhinology & Allergy. 2016;1:1-6.
48. Koo BS, Jung BJ, Kim SG, Liang ZL, Yeong MK, Rha KS. Altered expression of E-cadherin and catenin in malignant trasformation of sinonasal inverted papillomas. Rhinology. 2011;49(4):479-85.
49. Wu HH, Zafar S, Huan Y, Yee H, Chiriboga L, Wang BY. Fascin over expression is associated with dysplastic changes in sinonasal inverted papillomas: a study of 47 cases. Head and Neck Pathol. 2009;3:212-216.
50. Huang CC, Lee TJ, Chang PH, et al. Desmoglein 3 is overexpressed in inverted papil-loma and squamous cell carcinoma of sinonasal cavity. Laryngoscope. 2010;120:26-29.
51. Yu H, Liu Q, Wang H, Wang D, Hu L, Sun X, Liu J. The role of tissue factor path- way inhibitor-2 in malignant transformation of sinonasal inverted papilloma. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2014;271:2191–2196.
52. Byun JY, Lee SH, Shin JM, Baek BJ, Lee JY. Overexpression of angiomotin in sinon-asal inverted papilloma. Int Forum Allergy Rhinol. 2014;4(6):512-516.
53. Liu W, Li Z, Luo Q, et al. The elevated expression of osteopontin and vascular endothelial growth factor in sinonasal inverted papilloma and its relationship with clinical severity. Am J Rhinol Allergy. 2011;25(5):313-317.
54. Huang CC, Lee TJ, Chang PH, Lee YS, Chuang CC, Jhang YJ, Chen YW, Chen CW, Fu CH, Tsai CN. Expression of cathepsin S and its inhibitor stefin A in sinonasal inverted papilloma. Rhinology. 2010;48(3):352-357.
55. Schrock A, Goke F, Wagner P, Bode M, Franzen A, Huss S, Agaimy A, Ihrler S, Kirsten R, Kristiansen G, Bootz F, Lengerke C, Perner S. Fibroblast growth fac- tor receptor-1 as a potential therapeutic target in sinonasal cancer. Head & Neck. 2014;9;1253-1257.

56. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nature medicine. 2004;10:942–9.

57. Strauss L, Bergmann C, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. The frequency and suppressor function of CD4+CD25highFoxp3+ T cells in the circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. 2007;13:6301–11.

58. Gu Y, Wang C, Han D, Zhang L. Increased frequencies of CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells in human nasal inverted papilloma. Head & neck. 2011;33:1005–12.

59. Jin J, Lee JW, Rha KS, Kim DW, Kim YM. Expression pattern of IQGAP1 in sinonasal inverted papillomas and squamous cell carcinomas. Laryngoscope. 2012;122(12):2640-2646.

60. Starska K, Brys M, Forma E, Olszewski J, Pietkiewicz P, Lewy-Trenda I, Stasikowska-Kanicka O, Danilewicz M, Krzeslak A. Metallothioneinsinonasal inverted papilloma (Schneiderian papilloma). Tumor Biol. 2015;36:8559-8571.

61. Bhalla RK, Wright ED. Predicting the site of attachment of sinonasal inverted papilloma. Rhinology. 2009;47:345–348.

62. Okamoto T, Kodama S, Nomi N, et al. Expression of bone morphogenicprotein in sinonasal inverted papilloma with new bone formation. Allergy Rhinol (Providence). 2011;2:16 –20.

63. Lee DK, Chung SK, Dhong HJ, Kim HY, Kim HJ, Bok KH. Focal hyperostosis on CT of sinonasal inverted papilloma as a predictor of tumor origin. AJNR Am J Neurora- diol. 2007;28:618–621.

64. Yousuf K, Wright ED. Site of attachment of inverted papilloma predicted by CT findings of osteitis. Am J Rhinol. 2007;21:32–36.

65. Sham CL, King AD, van Hasselt A, Tong MC. The roles and limitations of computed tomography in the preoperative assessment of sinonasal inverted papillomas. Am J Rhinol. 2008;22:144–150.

66. Ojiri H, Ujita M, Tada S, et al. Potentially distinctve features of sinonasal inverted papilloma on MR imaging. AJR Am J Roentgenol. 2000;175:465-468.

67. Chawla A, Shenoy J, Chokkappan K, Chung R. Imaging features of sinonasal inverted papilloma: a pictorial review. Current Problems in Diagnostic Radiology 2015; Published online Nov 26; DOI:10.1067/j.cpradiol.2015.10.004.

68. Jeon TY, Kim HJ, Choi JY, et al. 18F-FDG PET/CT findings of sinonasal inverted papilloma with or without coexistent malignancy: comparison with MR imaging findings in eight patients. Neuroradiology. 2009;51:265–271.

69. Karkos PD, Khoo LC, Leong SC, et al. Computed tomography and/or magnetic resonance imaging for preoperative planning for inverted nasal papilloma: review of evidence. J Laryngol Otol. 2009;123:705-709.

70. Dukor RK. Vibrational spectroscopy in the detection of cancer. In: Chalmers JM, Griffiths PR, eds. Handbook of Vibrational Spectroscopy. Chichester, UK: John Wiley and Sons Ltd; 2002. p. 3335.

71. Giorgini E, Sabbatini S, Conti C, Rubini C, Rocchetti R, Re M, Vaccari L, Mitri E, Librando V. Vibrational mapping of sinonasal lesions by Fourier transform infrared imaging spectroscopy. Journal of Biomedical Optics. 2015 December; 20(12),125003-7.

72. Krouse JH. Development of a staging system for inverted papilloma. Laryngoscope. 2000;110(6):965–968.

73. Acevedo-Henao CM, Talagas M, Marianowski R, Pradier O. Recurrent inverted papilloma with intracranial and temporal fossa involvement: a case report and review of the literature. Cancer Radiother. 2010;14:202-205.

74. CannadySB,BatraPS,SautterNB,RohHJ,CitardiMJ.Newstagingsystemforsinon- asal inverted papilloma in the endoscopic era. Laryngoscope. 2007;117(7):1283–1287.

75. Adriansen FJ, Lim KH, Georgalas C, Reinartz SM, Fokkens WJ. Challanges in the management of inverted papilloma: a review of 72 revision cases. The Laryngo- scope. 2015;126:322-328.

76. Sciarretta V, Fernandez IJ, Farneti P, Pasquini E. Endoscopic and combined exter- nal–transnasal endoscopic approach for the treatment of inverted papilloma: analy- sis of 110 cases. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2014;271:1953–1959.

77. Walgam E, Ahn C, Batra PS. Surgical management of frontal sinus inverted papil- loma: a systematic review. Laryngoscope. 2012;122:1205-1209.

78. Lombardi D, Tomenzoli D, Buttà L, Bizzoni A, Farina D, Sberze F, Karligkiotis A, Castelnuovo P, Nicolai. Limitations and complications of endoscopic surgery for treatment for sinonasal inverted papilloma: a reassessment after 212 cases. Head & Neck. 2011;10:1154-1161.

79. Reh DD, Lane AP. The role of endoscopic sinus surgery in the management of sinon- asal inverted papilloma. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2009;17:6–10.

80. Landsberg R, Cavel O, Segev Y, Khafif A, Fliss D. Attachement-oriented endoscopic surgical strategy for sinonasal inverted papilloma. American Journal of Rhinology. 2008;22:629-634.

81. Busquets JM, Hwang PH. Endoscopic resection of sinonasal inverted papilloma: a meta-analysis. Otolaryngol Head Neck Surg. 2006;134:476–482.

82. Karkos PD, Fyrmpas G, Carrie SC, Swift AC. Endoscopic versus open surgical interventions for inverted nasal papilloma: a systematic review. Clin Otolaryngol. 2006;31:499–503.

83. Minovi A, Kollert M, Draf W, Bockmühl U. Inverted papilloma: feasibility of endonasal surgery and long-term results of 87 cases. Rhinology. 2006;44:205–210.

84. Tomenzoli D, Castelnuovo P, Pagella F, et al. Different endoscopic surgical strategies in the management of inverted papilloma of the sinonasal tract: experience with 47 patients. Laryngoscope. 2004;114:193–200.

85. Stammberger H. Zum invertierten papillom der nasenchleimhaunt. HNO. 1981;29:128-133.

86. Lin GC, Akkina S, Chinn S, Prince ME, McHugh JB, Carey T, Zacharek MA. Sinonasal inverted papilloma: prognostic factors with emphasis on resection margins. J Neurol Surg B Skull Base. 2014;75(2):140-146.

87. Chiu AG, Jackman AH, Antunes MB, et al. Radiographic and histologic analysis of the bone underlying inverted papillomas. Laryngoscope. 2006;116:1617–1620.

88. Brors D, Draf W. The treatment of inverted papilloma. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 1999;7:33-38.

89. Bignami M, Pistochini A, Meloni F, Delahaye E, Castelnuovo P. A rare case of oncocytic Schneiderian papilloma with intradural and intraorbital extension with notes of operative techniques. Rhinology. 2009;47:316–319.

90. Draf W. Endonasal micro-endoscopic frontal sinus surgery: the Fulda concept. Op Tech Otolaryngol Head Neck Surg. 1991;2:234–240.

91. Weber R, Draf W, Kratzsch B, et al. Modern concepts of frontal sinus surgery. Laryngoscope. 2001;111(1):137–146.

92. Adriansen GF, Lim KH, Georgalas C, Reinartz SM, Fokkens W. Challenges in the management of inverted papilloma: a review of 72 revision cases. Laryngoscope. 2015 Sep7.

93. Lund VJ. Optimum management of inverted papilloma. J Laryngol Otol. 2 0 0 0 ; 1 1 4 : 1 9 4 – 1 9 7.

94. Hong SL, Kim BH, Lee JH, Cho KS, Roh HJ. Smoking and malignancy in sinonasal inverted papilloma. Laryngoscope. 2013;123(5):1087-1091.

95. Xiao-Ting W, Peng L, Xiu-Qing W, Hai-Bo W, Wen-Hui P, Bing L, Er-Peng Z, Guang-Gang S. Factors affecting recurrence of sinonasal inverted papilloma. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2013;270:1349–1353.

96. Kim DY, Hong SL, Jin HR, et al. Inverted papilloma of the nasal cavity and paranasal sinuses: a Korean multicentric study. Laryngoscope, 2012;122(3):487-494.

97. Suh JD, Ramakrishnan VR, Thompson CF, Woodworth BA, Adappa ND, Nayak J, Lee JM, LeeJT, Chiu AG, Palmer JN. Inverted papilloma of the sphenoid sinus: risk factors for disease recurrence. Laryngoscope. 2014 Nov 24.

98. Lesperance MM, Esclamado RM. Squamous cell carcinoma arising in inverted papilloma. Laryngoscope. 1995;105(2):178–183.

99. Ambros V. The functions of animal microRNAs. Nature. 2004;431:350-355

100. Zamore PD, Haley B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs. Science. 2005;309:1519-1524.

101. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. Nucleic Acids Res. 2006 Jan 1;34(Database issue):D140-4.

102. Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. 2006 Mar;22(3):165-73

103. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. Nat Struct Mol Biol. 2006 13:1097-101.

104. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 2004;116:281–97.

105. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. RNA, 2004; 10:1957–1966

106. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, et al. A microRNA expression

signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:2257–61.

107. Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, MorganDL, Postier RG, Brackett DJ, Schmittgen TD. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. Int J Cancer 2007;120:1046–54.

108. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. Cancer Cell 2006;9:189–98.

109. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, Shimotohno K. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. Oncogene 2006;25:2537–45.

110. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:11755–60.

111. Ferdin J, Kunej T, **Calin** GA: Non-coding RNAs: identification of cancer-associated microRNAs by gene profiling. Technol Cancer Res Treat. 2010 Apr;9(2):123-38. Review.

112. Gregory RI, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer. Cancer Res. 2005 May 1;65(9):3509-12.

113. Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjärn M, Hansen H, Berger U, Gullans S, Kearney P, Sarnow P, Straarup E and Kauppinen S. (2008). *Nature*, 452, 896-899.

114. 5. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. Cancer Cell 2006;9:189–98

115. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med 2005;353:1793–801.

116. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. Cancer Res 2004;64:3753–6.

117. Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, Taccioli C, Zanesi N, Garzon R, Aqeilan RI, Alder H, Volinia S, Rassenti L, Liu X, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M and Croce CM. (2008). *Proc Natl Acad Sci USA*.

118. Marcet B, Chevalier B, Luxardi G, Coraux C, Zaragosi LE, Cibois M, Robbe-Sermesant K, Jolly T, Cardinaud B, Moreilhon C, Giovannini-Chami L, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Waldmann R, Kodjabachian L, Barbry P. Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. Nat Cell Biol. 2011;13(6):693-9. doi:10.1038/ncb2241.

119. Chevalier B, Adamiok A, Mercey O, Revinski DR, Zaragosi LE, Pasini A, Kodjabachian L, Barbry P, Marcet B. miR-34/449 Control Apical Actin Network Formation During Multiciliogenesis Through Small GTPase Pathways. Nat Commun. 2015 Sep 18;6:8386. doi: 10.1038/ncomms9386.

120. Nature. 2014 June 5; 510(7503): 115–120. doi:10.1038/nature13413.

121. Benoit Chevalier, Anna Adamiok, Olivier Mercey, Diego R. Revinski, Laure-Emmanuelle Zaragosi, Andrea Pasini, Laurent Kodjabachian, Pascal Barbry & Brice Marcet miR-34/449 control apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase pathways DOI: 10.1038/ncomms9386.

122. Yong-Ming H, Ai-Jun J, Xiao-Yue X, Jian-Wei L, Chen Y, Y Chen. miR-449a: A Potential Therapeutic Agent for Cancer. Anticancer Drugs. 2017 Nov;28(10):1067-1078. doi: 10.1097/CAD.0000000000000555.

123. Wu D, Liu J, Chen J, He H, Ma H, Lv X. miR-449a Suppresses Tumor Growth, Migration, and Invasion in Non-Small Cell Lung Cancer by Targeting a HMGB1-Mediated NF-κB Signaling Pathway. Oncol Res. 2019 Feb 5;27(2):227-235. doi: 10.3727/096504018X15213089759999.

124. Ishikawa D, Takasu C, Kashihara H, Nishi M, Tokunaga T, Higashijima J, Yoshikawa K, Yasutomo K, Shimada M. The Significance of MicroRNA-449a and Its Potential Target HDAC1 in Patients With Colorectal Cancer. Anticancer Res. 2019 Jun;39(6):2855-2860. doi:10.21873/anticanres.13414.

125. Bou Kheir, Futoma-Kazmierczak E, Jacobsen A, Krogh A, Bardram L, Hother C, Grønbæk K, Federspiel B, Lund AH, Friis-Hansen L. miR-449 Inhibits Cell Proliferation and Is Down-Regulated in Gastric Cancer. Mol Cancer. 2011 Mar 18;10:29. doi: 10.1186/1476-4598-10-29.

126. Wang L, Zhao Y, Xiong W, Ye W, Zhao W, Hua Y. MicroRNA-449a Is Downregulated in Cervical Cancer and Inhibits Proliferation, Migration, and Invasion. Oncol Res Treat. 2019;42(11):564-571. doi: 10.1159/000502122.

127. Coppola V, De Maria R, Bonci D. MicroRNAs and prostate cancer. Endocr Relat Cancer. 2010;17(1):F1-17. doi: 10.1677/ERC-09-0172.

128. Shi W, Bruce J, Lee M, Yue S, Rowe M, Pintilie M, Kogo R, Bissey PA, Fyles A, Yip KW, Liu FF. MiR-449a promotes breast cancer progression by targeting CRIP2. Oncotarget. 2016;7(14):18906-18. doi: 10.18632/oncotarget.7753.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio dal profondo del cuore

Il Professor Massimo Re per essere un maestro di conoscenza e sapienza.

Il Dott. Marco Tomasetti per tutto l'aiuto che mi ha offerto.

Il personale del reparto di Otorinolaringoiatria per avermi gioiosamente accolta, sempre.

I Professori del corso per le preziose occasioni di crescita.

I miei genitori Roberto e Raffaella per avermi donato la possibilità di vivere

secondo l'amore e la forma dei miei progetti creativi.

Mia sorella Mariachiara e mio fratello Gabriele per essere le Stelle della mia vita.

Le mie sorelle d'anima Angelica, Irene e Sabrina per esserci sempre al di là del tempo.

Le compagne di medicina Rossella, Roberta, Annalisa e Giulia per la gioia di averle conosciute.

Tutta la mia amata famiglia di parenti e amici.

Il Dott. Ferdinando Montuschi per avermi accompagnata ad esplorare l'esistenza

quando ogni senso era andato perduto.

Ringrazio la Vita che si rivela nel mistero di ogni nuovo giorno.

Lucia Stella