

INDICE.....	1
RIASSUNTO.....	3
INTRODUZIONE	5
LE NEOPLASIE MALIGNI E DELLE CAVITA' NASALI E DEI SENI PARANASALI.....	5
EZIOLOGIA.....	7
STORIA NATURALE.....	14
SEGNI E SINTOMI.....	19
DIAGNOSI.....	21
STADIAZIONE.....	22
TERAPIA.....	27
TERAPIA CHIRURGICA.....	27
RADIOTERAPIA.....	31
CHEMIOTERAPIA.....	31
FATTORI PROGNOSTICI.....	32
FATTORI PROGNOSTICI DELLE NEOPLASIE DEL DISTRETTO NASO-SINUSALE.....	37
ADENOCARCINOMA NASO-SINUSALE.....	38
ADENOCARCINOMA DI TIPO INTESTINALE NASO-SINUSALE.....	39
MiRNA.....	46
Mir-34 e Mir-449.....	51
Mir-205.....	52

STUDIO SPERIMENTALE.....	54
SCOPO E DISEGNO DELLO STUDIO.....	54
MATERIALI E METODI.....	54
CRITERI DI INCLUSIONE ED ESCLUSIONE.....	54
ANALISI STATISTICA.....	58
RISULTATI.....	59
DISCUSSIONE.....	70
CONCLUSIONI.....	74
RINGRAZIAMENTI.....	75
BIBLIOGRAFIA.....	76

RIASSUNTO

Obiettivo dello studio: valutare il ruolo ed il possibile significato clinico-prognostico dell'espressione di specifici microRNAs nell'adenocarcinoma di tipo intestinale dei seni paranasali (ITACs).

Materiali e metodi: studio di coorte retrospettivo su 31 pazienti sottoposti ad intervento chirurgico primario per adenocarcinoma di tipo intestinale dei seni paranasali con iniziale analisi del miRNoma tramite tecnologia Next Generation Sequencing (NGS) sui campioni chirurgici di tessuto tumorale e sano adiacente

Dall'analisi del miRNoma è stato identificato un profilo di miRNAs costituzionalmente deregolati nel tumore 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, sono stati selezionati 4-miRNAs (miR-34b, miR-192, miR-205, miR-449a), i quali sono stati successivamente validati sulla popolazione di pazienti ITAC.

Allo scopo di valutarne il valore clinico, l'espressione dei 4-miRNAs dei pazienti ITAC è stata correlata con lo stadio clinico del tumore. Inoltre, la sopravvivenza globale (overall survival, OS) e il tempo libero da malattia (disease-free survival, DFS) sono state analizzate mediante la curva Kaplan-Meier e i gruppi dei miRNA (sotto e sopra la mediana) sono stati confrontati usando il test log-rank.

L'analisi di regressione multivariata di Cox è stata utilizzata per valutare i fattori di predizione indipendenti di sopravvivenza. 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: sia l'espressione del miR-205 che del miR-449a erano significativamente correlate al tempo libero da malattia (Disease Free Survival). In particolare, elevati livelli dei due miRNAs (up-regulation) erano associati ad un più alto rischio di recidiva e quindi ad una prognosi peggiore. L'analisi multivariata conferma il valore predittivo indipendente del miR-205 e miR-449a. Bassi livelli (down-regulation) di miR-205 o miR-449a si correla ad un rischio di recidiva, rispettivamente di circa 11 e 3 volte.

Conclusioni: Il presente studio fornisce la prima evidenza che una iperespressione di miR-205 e miR-449a negli adenocarcinomi di tipo intestinale etmoidale (ITAC) è associata ad un maggior rischio di recidiva (ridotto tempo libero da malattia -Desease Free Survival- DFS) e ad una ridotta sopravvivenza complessiva (Overall Survival - OS), suggerendo che la mutazione di questi microRNAs in combinazione con ulteriori eventi genetici, potrebbe svolgere un ruolo significativo nella patogenesi dell'ITAC.

INTRODUZIONE

LE NEOPLASIE MALIGNI DELLE CAVITÀ NASALI E DEI SENI PARANASALI

Le neoplasie maligne delle cavità nasali e dei seni paranasali rappresentano complessivamente l'1% circa di tutti i tumori maligni dell'uomo ed hanno un'incidenza di 0.1-1.4 nuovi casi/anno/100000 abitanti. Costituiscono inoltre l'1.4 % dei tumori delle vie aereo-digestive superiori ed il 3% delle neoplasie della testa e del collo. Colpiscono più frequentemente i maschi tra la sesta e la settima decade di vita (rapporto M/F 2:1). Il 60% dei tumori naso-sinusali origina nel seno mascellare e seno etmoidale e l'1% nel seni sfenoidale e frontale ^(1, 2, 3, 4).

L'incidenza è 500 volte maggiore tra i lavoratori di legname e pellame con un RR di 4,4 ⁽⁵⁾. Nel Mondo le aree geografiche più colpite sono i paesi asiatici, quali il Giappone, l'India e alcune regioni della Cina, in Italia la maggiore frequenza è riscontrata in Piemonte ed in Lombardia. La patologia ha dimostrato una incidenza stabile nelle ultime decadi.

Dal punto di vista istologico si possono distinguere diversi istotipi così classificati dalla WHO (World Health Organization) nel 2005:

1. Carcinoma squamocellulare
2. Adenocarcinoma (ITAC)
3. Carcinoma adenoidocistico
4. Carcinoma indifferenziato
5. Carcinoma mucoepidermoide
6. Sarcomi
7. Carcinomi a differenziazione neuroendocrina:
carcinoma naso-sinusali indifferenziato (SNUC)

carcinoma naso-sinusali neuroendocrino (SNEC)

carcinoma indifferenziato a piccole cellule (SCCNT)

8.esteso neuroblastoma

9. NAS (non altrimenti specificati).

EZIOLOGIA

L'insorgenza dei tumori naso-sinusalì presenta documentate correlazioni con particolari fattori di rischio legati ad alcune esposizioni professionali.

Industria del legno

I lavoratori del settore del mobile sono più a rischio dei lavoratori generici del legno di sviluppare adenocarcinomi. Il rischio sembra essere più elevato per gli esposti a 'legni duri' (la maggior parte delle latifoglie) rispetto agli esposti a 'legni teneri' (la maggior parte delle conifere).

Un rischio aumentato viene messo in evidenza anche nelle operazioni di carpenteria ed in altre fasi di lavorazione del legno. La IARC (International Agency for Research on Cancer) classifica le operazioni di carpenteria nel gruppo 2B e le operazioni di taglio del bosco e di segagione nel gruppo 3 (si veda **Tab. I**) ^(6, 7).

Tab. I Rischio cancerogenetico per l'uomo in relazione a sostanze chimiche e circostanze di esposizione .

Gruppo I	Agenti cancerogeni per l'uomo e circostanze di esposizione sicuramente cancerogene
Gruppo II	IIa) Agenti probabilmente cancerogeni ed esposizioni probabilmente cancerogene IIb) Agenti possibilmente cancerogeni ed esposizioni possibilmente cancerogene
Gruppo III	Agenti non classificabili come cancerogeni
Gruppo IV	Agenti che probabilmente non sono cancerogeni per l'uomo

Allo stato attuale, le sostanze ed i processi produttivi inseriti dalla IARC nel gruppo I per i quali è stato dimostrato un eccesso di rischio per il carcinoma naso-sinusale sono:

- composti del nichel
- produzione di mobili
- produzione e riparazione di stivali e scarpe
- produzione dell'alcool isopropilico con il metodo dell'acido forte ⁽⁷⁾

Una metanalisi su studi effettuati in vari paesi conferma per gli adenocarcinomi un rischio relativo pari a 20,2 per i lavoratori del mobile ⁽⁸⁾.

Da questi studi inoltre emergono dati che permettono di formulare ipotesi sui meccanismi di cancerogenesi. I principali sospetti si sono concentrati ovviamente sulla polvere di legno, in particolare di legni duri, e i suoi costituenti naturali. Fra questi ultimi vanno attentamente considerati i tannini e gli acidi tannici (sostanze a struttura polifenolica che sono contenute per lo più nelle latifoglie); le aldeidi *alfa-beta* insature (ovvero i loro prodotti di ossidazione come alcuni benzochinoni); le sostanze catramose che si liberano nel riscaldamento del legno durante la lavorazione quali creosoto, i clorofenoli, i sali di cromo e di arsenico e le resine formaldeidiche ^(9, 10). Il periodo di induzione-latenza tra l'inizio dell'esposizione e la diagnosi è stato stimato essere di 40 anni come valore medio ⁽¹⁰⁾.

L'ipotesi di cancerogenicità più accreditata resta comunque quella dei tannini, che, come è noto, sono capaci di alterare per precipitazione la struttura delle proteine e di intervenire nel metabolismo cellulare nelle fasi di replicazione; di essi è conosciuta l'azione cancerogena strumentale, specialmente per i tannini non idrolisabili. Sarebbero in causa i derivati delle catechine e delle leucoantocianidine. Studi sperimentali di iniezione sottocutanea di estratti di piante, legni ed acidi tannici hanno prodotto tumori nei topi e nei ratti: i tannini idrolisabili producono solo tumori al fegato, mentre quelli non idrolisabili ne producono anche a carico del sottocutaneo. La cancerogenicità non sembra legata all'acido gallico e al catecolo.

I tipi di legno maggiormente ricchi di tannini sono il castagno, il rovere, il quebako, il cedro rosso nel midollo; pino, abete, ontano, acacia, castagno, abete canadese e larice ne contengono quantità elevate nella corteccia.

Le dimensioni delle particelle di polvere che si producono durante le varie lavorazioni (in massima parte da 6 a 10 micron) ne consentono la filtrazione nelle cavità nasali; in tal modo si rende possibile il contatto diretto di fattori cancerogeni con la mucosa, favorito dall'inibizione della clearance muco ciliare provocata dalla polvere stessa ⁽¹⁰⁾. Le particelle si depositano soprattutto in due zone: nella parte anteriore del setto nasale e al limite anteriore del turbinato medio. Si tratta inoltre di particelle fiocose o fibrose con elevato rapporto superficie/volume ⁽¹¹⁾.

Industria del cuoio e delle calzature

Le prime segnalazioni di un eccesso di rischio per il cancro naso-sinusale in lavoratori del settore del cuoio e delle pelli risalgono ai primi anni '70 in lavoratori del Northamptonshire ⁽¹²⁾.

Il rischio appare di gran lunga più elevato per i lavoratori addetti alla produzione ed alla riparazione delle calzature rispetto ai lavoratori generici del cuoio se vengono tenuti in considerazione soltanto gli adenocarcinomi.

Esistono eccessi di rischio anche per le altre lavorazioni come la concia e la produzione di altri prodotti in pelle, anche se la IARC classifica queste lavorazioni nel gruppo 3, ovvero non classificabili come cancerogeni per l'uomo ^(6, 7).

Una casistica raccolta in vari centri italiani mostra, su 26 pazienti di sesso maschile affetti da carcinoma naso-sinusale con pregressa occupazione nel settore del cuoio e delle pelli, 23 addetti alla produzione ed alla riparazione delle calzature; per 21 soggetti era stata formulata diagnosi di adenocarcinoma ⁽¹³⁾.

I possibili agenti cancerogeni sono stati individuati nei concianti usati durante la preparazione delle pelli, come i tannini di origine vegetale o sintetica (e ciò costituirebbe il

punto di contatto fra lavorazioni del legno e del cuoio) ed i composti del cromo (sicuramente cancerogeno per il polmone) ^(13, 7)

Il periodo di latenza medio è circa 54,6 anni per gli adenocarcinomi (mentre per i tumori squamocellulari, di transizione e anaplastici è più breve, circa 41,7 anni), sostanzialmente più lungo rispetto a quello dei lavoratori del legno che manifestano lo stesso tipo istologico ⁽¹¹⁾.

Industria tessile e dell'abbigliamento.

Una correlazione tra esposizione nell'industria tessile e cancro naso-sinusale è stata riscontrata in molte nazioni, quali Inghilterra ^(14,15), Svezia ⁽¹⁶⁾, Finlandia ⁽¹⁷⁾, nonché Italia ⁽¹⁸⁾.

In Inghilterra fu notata un'aumentata incidenza di cancro tra i tappezzieri e i sarti, ma non tra i lavoratori dell'industria tessile; al contrario negli Stati Uniti è stato segnalato un aumento del rischio proprio tra i lavoratori dell'industria tessile ^(19, 20, 21). In Finlandia è stato descritto un eccesso di rischio soprattutto tra le magliaie, sia in ambiente domestico sia industriale ^(20, 16).

Una casistica italiana descrive 27 casi di carcinoma naso-sinusale in lavoratori dell'industria tessile. Il tipo istologico più frequente è il carcinoma squamocellulare: 12 casi contro 2 soli adenocarcinomi ⁽²¹⁾.

L'aumento del rischio appare maggiore per il sesso femminile, rispetto al maschile, ma questo dato è a nostro avviso dovuto all'alto numero di donne impiegato nel settore.

Il rischio è stato attribuito alla polvere di tessuto come tale, agli olii minerali presenti come impurità nel filato o nebulizzati dal movimento delle parti meccaniche dei telai, alla formaldeide (resine formaldeidiche applicate come antipiega durante le operazioni di finissaggio dei tessuti).

La IARC include l'industria tessile tra le esposizioni possibilmente cancerogene per l'uomo (gruppo 2b) ^(6,7).

Industria metallurgica e metalmeccanica

Un'associazione con l'esposizione a nichel fu segnalata per la prima volta nel 1933 ⁽²⁴⁾. Da allora molti studi epidemiologici hanno mostrato un eccesso significativo di rischio per questo tumore in lavoratori esposti principalmente a solfiti di nichel o ad ossidi e solfuri originatisi durante la raffinazione del nichel stesso ^(22, 23, 24). Il potere cancerogeno aumenta con l'aumentare dell'idrosolubilità dei composti ⁽²⁵⁾. Nel 1986 in una coorte di esposti furono reperiti 56 casi di tumore contro un valore atteso di 0.29 ⁽²⁶⁾.

Per quanto riguarda la localizzazione, nell'ambito dei seni paranasali è stata segnalata una particolare predilezione per l'etmoide ⁽²⁵⁾.

Il cromo, come noto, risulta essere biologicamente inerte e privo di effetti tossici, ma alcuni suoi composti come l'acido cromico, i cromati ed i bicromati provocano effetti dannosi quali avvelenamento acuto, ulcere cutanee, perforazioni del setto nasale, dermatiti, sintomi respiratori e cancro alle vie respiratorie, sia superiori sia inferiori ⁽²⁷⁾. La correlazione tra cancro dei seni paranasali ed esposizione al cromo fu ipotizzata già nel 1890, in seguito all'osservazione di un lavoratore esposto ⁽²⁸⁾. Ulteriori studi hanno dimostrato il ruolo nell'eziopatogenesi di questi tumori, dell'esposizione a composti esavalenti del cromo, soprattutto negli impianti di produzione dei cromati. Il tipo istologico più rappresentato è il carcinoma squamocellulare ^(29, 30). La IARC inserisce nel primo gruppo (tra i composti sicuramente cancerogeni per l'uomo) i composti del cromo, basandosi però su studi relativi a tumori polmonari ^(6, 7).

Altre esposizioni a rischio sono state individuate nel lavoro di fonderia, nelle operazioni di saldatura ed, in generale, in operai dell'industria metalmeccanica. Gli agenti eziologici possono essere ricercati negli olii minerali da taglio (contenenti idrocarburi policiclici aromatici =IPA), o nei composti del nichel e del cromo a cui questi lavoratori sono esposti ⁽³¹⁾.

Industria chimica

Sono state segnalate correlazioni tra cancro naso-sinusale e produzione di alcool isopropilico, un solvente molto utilizzato anche nella maggior parte dei laboratori chimici. Negli Stati Uniti sono stati osservati 6 casi di cancro dei seni paranasali tra lavoratori di due industrie chimiche, su un numero molto basso di soggetti studiati (75 e 79 rispettivamente) a testimonianza di un rischio eccedente rispetto a quello atteso ⁽³²⁾. La IARC include nel gruppo I la produzione di questo alcool con il metodo dell'acido forte. L'agente cancerogeno è probabilmente da ricercarsi in un composto intermedio, ancora sconosciuto, che si forma durante il processo. L'alcool isopropilico come tale è invece inserito nel gruppo III ^(6, 7).

In Giappone uno studio condotto tra i lavoratori dell'industria di produzione di gas mostarda, un gas tossico usato per motivi bellici e prodotto dal 1929 al 1945, ha mostrato un notevole aumento di mortalità (333 morti osservate rispetto alle 0.9 attese) e tra i casi osservati due erano carcinomi squamosi dei seni paranasali ⁽³³⁾.

Per la formaldeide è stato dimostrato che l'inalazione dei suoi vapori provoca carcinomi squamocellulari nelle cavità nasali di animali da esperimento; in uno studio condotto su 26.000 lavoratori impiegati in impianti che producevano o sintetizzavano formaldeide sono stati riscontrati due casi di carcinoma nasale contro 2,8 attesi ⁽³⁴⁾. Segnaliamo studi che riportano un rischio di neoplasia notevolmente aumentato nei lavoratori soggetti ad inalazione di questo composto ⁽³⁵⁾.

Industria estrattiva

Sono stati segnalati eccessi di rischio per minatori di carbone, soprattutto in Inghilterra e in Francia ^(14, 36).

Edilizia

Alcuni Autori hanno evidenziato eccessi di rischio per tumori nasali in addetti a costruzioni edilizie. Rivestono un'importanza determinante le esposizioni a polveri di legno (operazioni di carpenteria), a cromati presenti nel cemento, ad olii disarmanti ^(36,37).

Industria del vetro

Esistono segnalazioni di tumori nasali in addetti alla composizione in vetreria ⁽¹³⁾. Tale mansione può comportare esposizione ad As₂O₃ (anidride arseniosa) ed è nota la cancerogenicità dell'arsenico e dei suoi composti (Gruppo I IARC) ^(6, 7).

Agricoltura ed altre occupazioni con esposizione a pesticidi

Nel 1966 furono osservati 4 casi di cancro naso-sinusale in addetti alla preparazione di arsenio di piombo ⁽³²⁾. Recentemente anche in Toscana è stato segnalato un caso insorto in un agricoltore con esposizione pregressa a questo antiparassitario ⁽³⁸⁾. E' stata inoltre evidenziata un'associazione fra neoplasie naso-sinusalì di tipo squamocellulare e l'esposizione a clorofenoli e ad erbicidi fenossiacidi ^(39,40).

Altri fattori non occupazionali

L'influenza del fumo di tabacco nell'eziopatogenesi del carcinoma naso-sinusale è tuttora poco definita, la maggior parte degli studi riporta risultati negativi per tale associazione. Solo alcuni Autori propendono per un significativo eccesso di rischio nei fumatori, una volta controllata la variabile esposizione a cancerogeni professionali ^(41, 42).

Recentemente è stato ipotizzato un ruolo dell'uso abitudinario di spray nasali decongestionanti, indipendentemente da alterazioni anatomiche o patologiche delle prime vie respiratorie ⁽⁴³⁾, ma tale segnalazione appare limitata ad un abuso del farmaco.

Inoltre va ricordato che la sinusite cronica o una poliposi nasale possono essere considerati come fattori di rischio per il cancro nasale o per lo sviluppo di un carcinoma squamocellulare nel seno mascellare ^(44, 45, 46, 47).

STORIA NATURALE DELLE NEOPLASIE MALIGNI DELLE CAVITA' NASALI E DEI SENI PARANASALI

Seno mascellare

I tumori maligni del seno mascellare possono essere considerati primitivi solo nel 40% dei casi; nel 30% originano a livello della mucosa etmoidale, mentre meno frequentemente costituiscono un'evoluzione da parte di neoplasie insorte a livello delle mucose alveolare o del palato. In genere i tumori maligni originatisi all'interno di un seno mascellare non manifestano la tendenza ad interessare l'etmoide o la porzione superiore della fossa nasale corrispondente, ma tendono ad estendersi in direzione caudale, rostrale e posteriormente, raggiungendo rispettivamente il palato, l'orbita, i tessuti molli cutanei e le fosse pterigomascellare (FPM) ed infratemporale (FIT).

Per comprendere la tendenza evolutiva dei tumori maligni del seno mascellare occorre ricordare che l'antro di Higmoro presenta 4 peduncoli: osseo, malare, palatino (solidi) ed etmoido-nasale (fragile). Pertanto le vie di diffusione più frequenti sono:

- via palato-alveolare: i tumori a partenza dal pavimento del seno mascellare hanno una particolare tendenza ad invadere il processo alveolare del mascellare superiore, causando la progressiva caduta dei denti premolari e molari superiori. L'esteriorizzazione, oltre che attraverso gli alveoli dentari, può avvenire attraverso il palato duro ed il fornice gengivale, che appare inizialmente occupato da una massa sottumucosa, che, in secondo tempo, si ulcera;
- via superiore: verso l'orbita ed il suo contenuto, protetti dal periostio, ma raggiungibili attraverso le vie lacrimali ed il canale infraorbitario, spesso deiscente. L'invasione orbitaria può anche avvenire posteriormente nel contesto di un interessamento della base cranica. Superata la parete orbitaria, la neoplasia incontra una tenace resistenza da parte della periorbita che viene per lungo tempo dislocata, senza essere infiltrata;
- via anteriore: i rilievi superiore ed inferiore fanno parte delle strutture resistenti della faccia, ma sono separati da aree di relativa debolezza, ad esempio a livello

della fossa canina, che viene invasa precocemente nelle forme più aggressive e dà accesso alle parti molli del viso;

- via posteriore: il processo neoplastico può giungere ad interessare la pterigoide, la fossa pterigopalatina (FPP) e la loggia dei muscoli pterigoidei, da qui, attraverso il forame rotondo ed il tronco del nervo infraorbitario può penetrare in fossa cranica media;
- via zigomatica (qualora sia presente l' incostante prolungamento malare, a sua volta punto di partenza per l' estensione verso la FIT e la fessura sfenomascellare): l' invasione della FIT è relativamente frequente e rappresenta un elemento prognostico negativo delle neoplasie del seno mascellare. La tuberosità del mascellare infatti, è in rapporto con la FPP solo nella sua porzione superiore; il seno mascellare, invece, è in rapporto con la FIT con la sua faccia posteriore (a livello della fossa pterigoidea) e con quella laterale (a livello della regione retromaxillo-zigomatico). La struttura ossea dalla tuberosità mascellare, sostanzialmente fragile, viene precocemente invasa e superata dalle neoplasie interessanti la porzione posteriore del seno mascellare. Schawaab ⁽⁴⁸⁾ ha riscontrato che l' invasione della FIT è isolata solo nel 57 % dei casi; spesso è associato coinvolgimento dell'orbita (40 %) e della base cranica (3 %). Secondo Kondo et al. ⁽⁴⁹⁾ è frequente anche l'interessamento anteriore, e secondo Buaziz et al. ⁽⁵⁰⁾ il coinvolgimento della FIT è sempre associato ad altre aree di invasione, al di fuori del seno. Raggiunta la FIT, la neoplasia può erodere il basi cranio o penetrare attraverso i forami della base (ovale, rotondo, spinoso) o le strutture che li attraversano (2° e 3° branca del trigemino), invadendo la fossa cranica media.

Etmoide

La situazione anatomico-topografica dell'etmoide condiziona le modalità di propagazione delle neoplasie primitive di questa regione. I tumori maligni originatisi nell'etmoide possono estendersi:

- verso la fossa nasale, occupandola ed infiltrandone le pareti (turbinato inferiore, setto);

- all'orbita, quasi sempre attraverso l'erosione della lamina papiracea, ma teoricamente anche tramite i fori etmoidali anteriore e posteriore, in cui decorrono le arterie omonime;
- al sacco e al dotto naso-lacrimale;
- al seno mascellare ed al seno frontale: la diffusione avviene lungo i sepimenti ossei ed il complesso ostiomeatale;
- al seno sfenoidale, per estensione diretta dall' etmoide posteriore;
- all'apice orbitario, per erosione della sottile e talora deiscenza lamina ossea, che separa le cellule etmoidali posteriori dal cono orbitario posteriore e dal nervo ottico;
- al tavolato osseo frontale, alle ossa nasali ed ai tegumenti naso-frontali;
- alla fossa cranica anteriore (FCA), attraverso la lamina cribrosa oppure attraverso il seno frontale, nel caso in cui la sua parete posteriore sia invasa ed erosa.

L' infiltrazione delle pareti rinofaringee e del seno sfenoidale, per quanto teoricamente possibile, è evenienza molto rara, così come l'interessamento della FPM e della FIT. Queste due ultime direttrici sono proprie dei tumori maligni del seno mascellare. Esistono comunque neoplasie etmoide-mascellari molto estese, che si espandono secondo direttrici proprie di ciascuna delle due sedi: si tratta di casi nei quali è difficile stabilire con esattezza la sede di origine del tumore ^(51, 52).

Seno frontale

I tumori maligni del seno frontale sono rari. Possono esteriorizzarsi attraverso la parete anteriore del seno stesso oppure possono penetrare nell'orbita, attraverso la sua parete superiore. La parete posteriore del seno offre una certa resistenza alla progressione neoplastica; pertanto l'invasione endocranica da parte di questi tumori è un evento piuttosto tardivo. In alcuni casi si può verificare l'invasione del seno controlaterale. Inoltre si può avere l'interessamento dell'etmoide e da qui l'estensione in varie direzioni.

Seno sfenoidale

Raramente il seno sfenoidale è la sede di origine della neoplasia maligna: in letteratura si annoverano solo alcuni casi. Questi tumori hanno tendenza ad estendersi verso l'endocranio per usura del pavimento sellare e del clivus superiore e medio. Talora si può osservare un interessamento diretto del nervo ottico e, attraverso quest'ultimo, invasione dell'apice orbitario.

I tumori maligni naso-sinusali metastatizzano a distanza raramente in fase iniziale (osso, polmone, fegato, pachimeningite neoplastica). Di poco più frequente risulta essere la possibilità di metastasi linfonodali loco-regionali, allorché la neoplasia abbia superato lo stadio iniziale ⁽⁵³⁾. L'incidenza delle metastasi linfonodali al momento della diagnosi varia dal 3 % al 16 % (mediana del 10 %); con il progredire della malattia questa percentuale raggiunge il valore del 44 %. Metastasi linfonodali tardive possono comparire nei 4 anni successivi al primo trattamento, soprattutto in concomitanza di una recidiva loco-regionale. Differente è la situazione di una neoplasia naso-sinusale che si sia estesa verso il basso alla cavità orale. Il rischio di metastasi, in questo caso, è analogo a quello di una neoplasia primitiva del cavo orale. Come riassunto nella tabella II (**Tab. II**), metastasi linfonodali si riscontrano più frequentemente nei carcinomi naso-sinusali di tipo indifferenziato ed in quelli mucoepidermoidali ⁽⁵³⁾. La sede delle metastasi linfonodali è in rapporto con la sede di insorgenza e con le modalità di sviluppo del tumore.

Tab. II - Correlazione tra istotipo e modalità di diffusione metastatica

	Metastasi linfonodali (%)	Metastasi a distanza (%)
Carcinoma naso-sinusale	5,4-21	1,2-11,1
- tipo squamocellulare		
1. fosse nasali	6,6-10,7	
2. seno mascellare	3,9-21,4	2,6-13,8
- tipo indifferenziato	15,2-19,4	

- tipo a cellule cilindriche - tipo verrucoso	1,6-8,3	
Adenocarcinoma	2,6-22,2	Eccezionali (secondarie a metastasi linfonodali)
Carcinoma adenoido- cistico	9-16	18-58
Carcinoma mucoepidemoide	20-30	10

Si ricordi che i collettori linfatici dei seni paranasali, unendosi ai collettori delle cavità nasali, formano un sistema di vasi linfatici a direzione antero-posteriore, suddivisibile in 3 gruppi. Il gruppo superiore, termina nei linfonodi retro faringei, i cui vasi efferenti sono tributari del gruppo superiore delle linfoghiandole cervicali profonde. Il gruppo medio segue, con decorso parallelo, il gruppo superiore, terminando anch'esso nei linfonodi retrofaringei. Il gruppo inferiore, decorrendo lungo la parete posteriore del palato molle, si unisce ai vasi linfatici efferenti tonsillari e termina nel gruppo medio dei linfonodi cervicali profondi. Da questi dati si può dedurre che in tutte le neoplasie maligne della sovrastruttura e nella maggior parte di quelle della mesostruttura, il gruppo superiore dei linfonodi cervicali profondi è la seconda stazione linfonodale invasa dalla neoplasia; viceversa nei tumori maligni dell'infrastruttura la prima stazione linfonodale sede di metastasi è costituita dal gruppo medio delle linfoghiandole cervicali profonde.

SEGNI E SINTOMI

I tumori maligni dei seni paranasali decorrono solitamente, specie nelle fasi iniziali, in maniera asintomatica o con sintomi aspecifici. Questo silenzio clinico dipende dalle caratteristiche della sede anatomica dove la neoplasia si sviluppa accompagnandosi spesso a flogosi locale. Solo quando il tumore sconfina in distretti limitrofi, quali la cavità nasale, l'orbita, il palato duro, la cute oppure l'endocranio, compaiono segni e sintomi che sono indicatori di una fase tardiva dell'estensione neoplastica.

Etmoidi

Nei tumori maligni primitivi dell'etmoide i sintomi sono spesso sfumati ed aspecifici. I dolori sono i più frequenti sintomi di inizio, con un'incidenza leggermente inferiore al 50 %. Le algie alla fronte e alla radice del naso sono presenti nelle neoplasie delle cellule etmoidali anteriori, nelle quali frequentemente si sovrappone un processo flogistico del seno frontale per ostruzione del canale naso-frontale. L'interessamento dell'etmoide posteriore di solito provoca algie occipitali o irradiate al vertice, con andamento intermittente o continuo, dipendenti dalla flogosi secondaria etmoido-sfenoidale. In questa fase si presentano le algie orbiti oculari. La sintomatologia dolorosa, spesso associata a rinorrea monolaterale mucosa, muco-purulenta e talvolta con rare striature ematiche, può attenuarsi o recedere con terapia antiinfiammatoria ed antibiotica.

L'estensione del tumore nella fossa nasale omolaterale è accompagnata da ostruzione nasale, che ha un'incidenza superiore al 50 % sia per le forme ad esclusivo interessamento etmoidale sia per quelle etmoido-mascellari ^(54, 55, 56). Il progressivo accrescimento endonasale della neoplasia, con la conseguente dislocazione o infiltrazione del setto cartilagineo, è responsabile dell'ostruzione nasale controlaterale.

Il sanguinamento nasale, pur essendo un segno tardivo presente in circa il 35% dei casi ^(54, 55), rappresenta tuttavia il motivo per il quale più frequentemente il paziente giunge all'osservazione dello specialista. Le neoplasie a localizzazione etmoidale posteriore

possono dare origine ad emorragie nasali posteriori che talvolta vengono erroneamente scambiate per emoftoe.

Le manifestazioni oculari sono precoci nei tumori dell'etmoide anteriore e sono rappresentate da epifora, dacriocistite, diplopia, proptosi e da tumefazione in corrispondenza del canto interno. La proptosi, difficilmente riducibile, le alterazioni della motilità oculare e del campo visivo, e l'eventuale amaurosi sono rivelatori di un interessamento dell'etmoide posteriore.

L'estensione alla base cranica anteriore è in genere clinicamente muta fino a che non si sia verificato un sostanziale incremento volumetrico della neoplasia. L'infiltrazione della dura o l'invasione endocranica possono talvolta manifestarsi clinicamente con la presenza esclusiva di cefalea al vertice o diffusa.

Anosmia monolaterale, per ostacolo meccanico alla corrente aerea endonasale o per infiltrazione dell'area olfattiva, viene riferita da meno del 5% dei pazienti ⁽⁵⁴⁾. Con molta probabilità la bassa incidenza di questo sintomo è da attribuire ad una sua sottovalutazione da parte del paziente o, più verosimilmente, alla presenza di una normale funzionalità olfattiva, controlaterale. Lo sconfinamento della neoplasia nella fossa nasale controlaterale, o la sua diffusione alla rinobase può determinare anosmia vera.

DIAGNOSI

La diagnosi clinica è estremamente difficoltosa in fase precoce e si avvale di:

- 1- Ispezione diretta ed endoscopica delle fosse nasali, del cavo orale-orofaringeo, del seno mascellare. Per l'ispezione endoscopica del seno mascellare ci si avvale di fibre ottiche rigide di 3 mm con campi di visione differenti e complementari (30°, 70°, 120°). Il fibroscopio flessibile si rivela peraltro particolarmente utile per l'esplorazione delle fosse nasali e del rinofaringe. I suoi limiti principali sono dati dall'impossibilità di esplorare il seno mascellare e dal fatto di fornire immagini meno nette con campo ristretto. La presenza di deformità della guancia, di edemi palpebrali, dislocazioni del bulbo oculare o dei denti costituisce un elemento suggestivo di una neoplasia in stadio avanzato.
- 2- Palpazione. Essa deve essere volta alla ricerca di eventuali (per quanto rare) adenopatie metastatiche laterocervicali e soprattutto alla valutazione dei punti trigger per la sintomatologia dolorosa oltre che per il riscontro di aree di ipo-anestesia.
- 3- Imaging. Si possono distinguere 4 steps successivi: identificazione, discriminazione, stadiazione, follow-up. Nelle prime due fasi, nelle quali la diagnosi di neoplasia viene definita, il ruolo dell'imaging è ampiamente subordinato alla clinica, mentre diviene di fondamentale importanza nelle fasi successive. Infatti se l'imaging è importante per la dimostrazione della presenza di una lesione, lo è assai meno per la tipizzazione della lesione stessa; a livello dei seni paranasali è particolarmente difficile e spesso impossibile dirimere con certezza la natura flogistica o neoplastica delle lesioni, specie se iniziali. Anche la presenza di usure ossee non è dirimente, sebbene sospetta, potendo essa essere determinata da sinusiti croniche di particolare gravità e lunga durata. L'utilità dell'imaging diviene invece capitale nella fase di stadiazione (per la valutazione dell'estensione) e di follow-up.
- 4- Biopsia. La biopsia endoscopica o a cielo aperto rappresenta l'elemento indispensabile per la diagnosi di certezza.

STADIAZIONE

Le neoplasie delle cavità nasali e dei seni paranasali costituiscono un capitolo di oncologia clinica dibattuto da lungo tempo. Verranno qui elencati quattro sistemi classificativi: il sistema di Ohngren modificato dalla UICC ⁽⁵⁷⁾ (**Tab. III e IV**), quello di Schwab (**Tab. V e VI**) ⁽⁵⁸⁾, quello di Calero (**Tab. VII**) ⁽⁵⁹⁾ e quello della AJCC (**Tab. VIII e IX**) ⁽⁶⁰⁾.

Il sistema di Ohngren pone l'attenzione sul seno mascellare, sito anatomico più frequentemente colpito e maggiormente studiato. L'Antro di Higmore diviene una regione suddivisa in due sedi dal piano di Ohngren: l'infrastruttura in cui sono classificabili i tumori T1 e T2 e la soprastruttura per i T3 e T4.

Tab. III – Classificazione anatomo-oncologica della UICC ⁽⁵⁷⁾

Regioni	Sedi	Sottosedi
SENO MASCELLARE	Soprastruttura	-
	Infrastruttura	-

Il piano di Ohngren è definito da una linea passante per il canto interno dell'orbita e l'angolo mandibolare che divide il mascellare in soprastruttura e infrastruttura (posta inferiormente). La soprastruttura include la parete posteriore del seno mascellare e la metà posteriore del pavimento orbitario.

Tab. IV – Classificazione oncologica generale della UICC ⁽⁵⁷⁾

T1	Contenuto alla mucosa antrale senza interessamento osseo
T2	Con interessamento osseo della infrastruttura incluso il palato duro e/o il meato medio nasale
T3	Infiltrante le seguenti strutture: cute, parete posteriore del seno mascellare, pavimento e parete mediale dell'orbita, etmoide anteriore
T4	Infiltrante il contenuto orbitario e/o le seguenti strutture: lamina cribra, etmoide posteriore e seno sfenoidale, rinofaringe, palato molle, fossa pterigo-mascellare, base cranica

La classificazione di Schwab ⁽⁵⁸⁾ definisce diverse sedi e sottosedi all'interno della regione delle fosse nasali e dei seni paranasali.

Tab. V - Classificazione anatomo-oncologica di Schwab ⁽⁵⁸⁾

Regioni	Sedi	Sottosedi
FOSSE NASALI E SENI PARANASALI	Fossa nasale	Pavimento Volta Parete laterale Setto
	Seno Mascellare	-
	Seni paranasali superiori	Angolo maxillo-etmoidale Etmoide Seno frontale Seno sfenoidale
	“Regioni adiacenti”	Orbita Cavo orale

Tab. VI – Classificazione generale di Schwaab ⁽⁵⁸⁾

T1	Limitato ad una sottosed
T2	Contenuto in una sottosed
T3	Coinvolgente due o tre sedi o una delle “regioni adiacenti”
T4	Coinvolgente entrambe le “regioni adiacenti” o altre strutture (i.e cute, fossa pterigo-palatina, base cranica, rinofaringe)

La classificazione di Calearo ⁽⁵⁸⁾ si fonda sulla visione unitaria delle cavità pneumatiche del massiccio facciale. Esse sono poste al centro del terzo medio del viso e nell’insieme costituiscono un’unità morfogenetica, anatomica e funzionale.

La regione oncologica massiccio facciale è quindi costituita dall’insieme delle fosse nasali e dalle cavità pneumatiche ad esse collegate. I suoi limiti sono definiti dai setti ossei che separano dette cavità dalle regioni finitime.

Nel contesto della regione sono individuate le singole sedi corrispondenti a ciascun seno paranasale. Viene così stabilita la equipotenzialità patogenetica fra e diverse cavità.

Nell’ambito delle diverse sedi sarebbe necessario individuare delle zone al fine di ottenere un sistema che descriva in termini dimensionali lo sviluppo della malattia: ciò è attuabile solo in alcuni casi (i.e. il seno sfenoidale non è suddivisibile in zone e pertanto una neoplasia insorgente in tale sede è da considerarsi un T2 ab initio).

E’ stato così introdotto il concetto di infiltrazione.

La stadiazione della progressione tumorale dipende sia dalla acquisizione da parte delle cellule neoplastiche di caratteristiche biologiche di malignità (infiltrazione, osteolisi) sia dallo specifico confine osseo che viene ad essere superato (nei T2 setti ossei di separazione fra cellette di uno specifico seno – per es. fra cellule etmoidali -, nei T3 setti ossei di separazione fra cavità pneumatiche adiacenti – per es. fra etmoide e fossa nasale -, nei T4 setti di separazione con regioni oncologiche vicine – per es. cavo orale, fossa cranica, etc.) .

Tab. VII – Classificazione anatomo-oncologica di Calero ⁽⁵⁹⁾

Regioni	Sedi	Sottosede
MASSICCIO FACCIALE	Fossa nasale	Pavimento
		Setto
		Parete laterale
		Volta
		Vestibolo
	Seno mascellare	Pavimento
		Parete antero-laterale
		Parete mediale
		Parete posteriore
		Parete superiore
	Etmoide	Anteriore
		Posteriore
	Seno frontale	
	Seno sfenoidale	

Il sistema di stadiazione approvato dalla AJCC considera due regioni, una mascellare e una naso-etmoidale. (**Tab. VIII e IX**) ⁽⁶⁰⁾.

Tab. VIII - Stadiazione TNM (AJCC). Lesioni etmoidali

T1	Lesione limitata ad una qualsiasi sottosedo in presenza o assenza di erosione o distruzione della struttura ossea
T2	Lesione che invade due sottosedo in una singola regione o si estende fino a coinvolgere una regione adiacente all'interno del complesso naso-etmoidale, in presenza o assenza di erosione o distruzione della struttura ossea
T3	Lesione che invade la parete mediale dell'orbita, il seno mascellare, il palato, o la lamina cribrosa.
T4a	Lesione che invade una qualsiasi delle seguenti strutture: strutture introrbitarie anteriori, cute del naso o della guancia, lamine pterigoidee, minima invasione della fossa cranica anteriore, seni frontali o sfenoidale.
T4b	Lesione che invade una qualsiasi delle seguenti strutture: apice dell'orbita, pachimeningi, cervello, fossa cranica media, nervi cranici oltre al ramo mascellare del trigemino (V2), nasofaringe, o clivus

Tab. IX - Stadiazione TNM (AJCC). Lesioni mascellari

T1	Lesione limitata al seno mascellare senza erosione o distruzione della struttura ossea
T2	Lesione che causa erosione o distruzione della struttura ossea, si estende al palato duro e/o il meato nasale medio, fatta eccezione dell'estensione alla parete posteriore del seno mascellare e ai processi pterigoidei
T3	Lesione che invade qualsiasi delle seguenti strutture: parete posteriore del seno mascellare, tessuto sottocutaneo, pavimento o parete mediale dell' orbita, fossa pterigoidea, seno etmoidale.
T4a	Lesione che invade le strutture introrbitarie anteriori, cute della guancia, lamine pterigoidee, fossa infratemporale, lamina cribrosa, seni frontali o sfenoidale.
T4b	Lesione che invade qualsiasi delle seguenti strutture: apice dell'orbita, pachimeningi, cervello, fossa cranica media, nervi cranici oltre al ramo mascellare del trigemino (V2), nasofaringe, o clivus

TERAPIA

I protocolli terapeutici prevedono l'uso in modo più o meno integrato di chirurgia, radioterapia e chemioterapia.

TERAPIA CHIRURGICA

Chirurgia su T

La chirurgia exeretica delle neoplasie naso-sinusali, sia essa isolata o in combinazione con altre modalità di trattamento, rappresenta l'approccio fondamentale per tali tumori.

Essa deve tenere conto genericamente dei seguenti principi:

- 1) necessità di circoscrivere la lesione nel modo più ampio, tenendo presenti le barriere anatomiche più efficaci anche in considerazione dell'istologia del tumore;
- 2) realizzazione dell'asportazione in monoblocco;
- 3) creazione di cavità residue facilmente esplorabili nel follow-up;
- 4) conoscenza degli effetti delle eventuali terapie adiuvanti sui tessuti residui;
- 5) associazione di tempi ricostruttivi immediati;
- 6) preparazione di tempi ricostruttivi posticipati;
- 7) necessità di conseguire una guarigione sufficientemente rapida in modo da consentire la messa in atto delle terapie adiuvanti in tempi opportuni.

Schematicamente, si possono distinguere due linee di trattamento chirurgico, l'una per tumori ancora relativamente limitati, l'altra per i casi ad evoluzione extraregionale.

Tumori senza evoluzione extraregionale

Si possono considerare tre tipi di intervento:

- 1- intervento endoscopico trans-nasale: in casi selezionati (T1 o T2) ha un out-come sovrapponibile agli approcci esterni con un notevole miglioramento della funzionalità delle vie aeree superiori e della qualità di vita del paziente. Le limitazioni all'approccio endoscopico sono, secondo alcuni autori^(61, 62), l'invasione da parte della massa tumorale dell'orbita e/o della dura madre e/o del cervello.
- 2- intervento transmaxillo-etmoido-nasale: ha come indicazione elettiva tumori etmoidali a scarsa malignità istologica (adenocarcinoma) a sviluppo endosinusale. Consiste nella tecnica classica descritta da Moure, cui si associa per esigenze di radicalità, l'asportazione della parete interna dell'orbita. L'exeresi comprende l'asportazione della parete interna dell'orbita e dell'etmoide, della parete anteriore e supero-interna del mascellare superiore con la giunzione etmoido-mascellare, della parete interna del pavimento orbitario e di tutto il setto intersinuso-nasale.
- 3- Maxillectomia parziale con conservazione del pavimento orbitario: trova indicazione elettiva per T1-T2 dell'infrastruttura, limitati alla mucosa del pavimento del seno e/o al bordo alveolare. L'exeresi comprende il seno mascellare e l'emipalato ad eccezione del pavimento orbitario e della giunzione etmoido-mascellare. Il posizionamento nell'immediato post-operatorio di un'endoprotesi ha significato funzionale ed estetico volto a ripristinare la masticazione, la I fase della deglutizione, la fonazione oltre a ridurre la retrazione cicatriziale cutanea.
- 4- Maxillectomia senza exenteratio orbitae: trova indicazione per T2-T3 dell'infrastruttura interessanti l'etmoide anteriore e/o il seno mascellare con possibile evoluzione anteriore senza interessamento del contenuto orbitario. L'exeresi prevede l'asportazione completa del distretto naso-etmoido-mascellare (emipalato in basso, pavimento orbitario e parte della papiracea in alto, parte della

parete posteriore dell'antro posteriormente. E' prevista la ricostruzione immediata del pavimento orbitario mediante materiale alloplastico, lembo muscolo-temporale, cartilagine settale, etc.

Tumori con evoluzione extraregionale

Si tratta di neoplasie T4 interessanti le sedi soprastanti il piano di Ohngren (T4B sec. Calero) (T4B AJCC). Si ricorda per i vantaggi dell'embolizzazione pre-operatoria e della possibile necessità di approcci combinati. Va ricordato inoltre che la stadiazione pre-operatoria, per quanto accurata, può spesso risultare sottostimata soprattutto a livello di zone critiche quali il tetto dell'etmoide, la lamina papiracea, le fosse pterigo-palatina ed infratemporale.

Vengono sinteticamente riportati i principali interventi:

- 1- Maxillectomia con exenteratio orbitae: indicazione elettiva è data dalle neoplasie con invasione del contenuto orbitario. Tale interessamento andrà valutato intraoperatoriamente, essendo meno attendibili le informazioni fornite dall'imaging. L'exenteratio viene eseguita prima della resezione del mascellare. Tecnicamente l'intervento prevede l'estensione del blocco di resezione a tutta l'orbita, incluso l'osso malare e parte dello zigomatico con l'eccezione del tetto orbitario e del terzo superiore della lamina papiracea. Per la frequente necessità di RT post-operatoria e per il miglior controllo della cavità nel follow-up pare preferibile una riabilitazione orbitaria mediante epitesi, mentre la riabilitazione della cavità chirurgica mascellare, come nel caso di maxillectomia senza exenteratio, avverrà intraoperatoriamente mediante il posizionamento di un'endoprotesi.
- 2- Cranio-facial resection: tale via combinata rino-neurochirurgica trova indicazione in neoplasie con erosione della papiracea ed iniziale infiltrazione intracranica. Controindicazioni alla resezione cranio-facciale anteriore sono rappresentate dalle metastasi a distanza e dalla massiva infiltrazione del lobo frontale. La tecnica

prevede l'asportazione del blocco maxillo-etmoidale con o senza l'exenteratio orbitale.

- 3- Antero-lateral transfacial approach: tale approccio trans facciale allargato (Mann) è indicato per T4 evolventi posteriormente nella fossa pterigo-mascellare con iniziale infiltrazione della regione infra-sfeno-temporale. Si ricorda come in questi casi la valutazione dei tessuti molli mediante RMN costituisca un tempo indispensabile per lo staging pre-operatorio. ⁽⁶³⁾
- 4- Via trans-facciale anteriore con approccio tipo Barbosa-Ferguson: è indicato nei casi in cui il processo neoplastico tenda ad evolvere oltre che posteriormente anche verso il trigono retro molare. Tale approccio permette di associare alla maxillectomia totale classica l'asportazione del trigono retro-molare e della porzione verticale della mandibola, resa possibile da un'ampia esposizione mediante un'incisione del fornice gengivale inferiore ⁽⁶⁴⁾.

Trattamento dell'N

Lo svuotamento latero-cervicale non trova giustificazione in relazione alle modalità di diffusione linfonodale. Alcuni autori suggeriscono un trattamento profilattico delle stazioni linfonodali del collo (sia esso chirurgico o radioterapico) in alcuni casi ed istotipi selezionati. La radioterapia complementare è l'unico trattamento efficace sui linfonodi retro faringei, mentre lo svuotamento latero-cervicale è indicato in caso di N clinicamente o radiologicamente evidente.

Relativamente ai risultati, la sopravvivenza a 5 anni, globalmente considerata per i vari istotipi e trattamenti, è del 50% complessivamente, di cui 70% per le forme localizzate, 45% per quelle a diffusione loco-regionale e 26% per quelle a distanza.

RADIOTERAPIA

La sottigliezza delle pareti delle cavità paranasali giustifica la loro precoce e frequente distruzione da parte della neoplasia; i margini di sicurezza della resezione chirurgica sono inoltre spesso limitati dalla prossimità di strutture critiche. Ciò vale in particolar modo per la parete posteriore del seno mascellare e per la fossa pterigo-palatina dove la radicalità chirurgica è spesso dubbia; l'infiltrazione può inoltre interessare il basi cranio e l'orbita, richiedendo interventi altamente demolitivi che non sempre vengono accettati dal paziente. Dalle suddette considerazioni emerge l'importanza del ruolo della radioterapia sia in posizione adiuvante sia quale trattamento elettivo per tumori inoperabili o per piccole neoplasie radiosensibili facilmente irradiabili con dosi elevate con scarso rischio per le strutture critiche (encefalo, retina, nervo ottico) ^(65, 66, 67, 68).

L'uso di tecniche altamente conformazionali, quali la radioterapia conformazionale 3D (3DCRT), la radioterapia ad intensità modulata (IMRT) e la terapia a fascio di protoni (PBT) hanno dimostrato la loro fattibilità anche in fase avanzata con significativa riduzione degli effetti collaterali.

CHEMIOTERAPIA

Nei carcinomi naso-sinusalì avanzati le localizzazioni a distanza, bersaglio della chemioterapia, sono presenti nel 5-15% dei casi. Gli istotipi adenocarcinoma-like (adenocarcinoma, carcinomi salivari) rispondono a farmaci diversi rispetto a quelli efficaci nei carcinomi spino cellulari. La chemioterapia viene utilizzata con diverse sequenze (neoadiuvante, adiuvante, concomitante e palliativa), per via venosa o arteriosa, con risultati differenti a seconda degli studi e dei farmaci impiegati^(69,70,71).

Nonostante gli sforzi terapeutici i risultati sono relativamente scarsi con i tassi di sopravvivenza globale a 5 anni che vanno dal 50% al 67% con il trattamento combinato e dal 15% al 38% con la sola radioterapia. Gli effetti collaterali legati al trattamento, inoltre, possono essere significativi.

FATTORI PROGNOSTICI

Valgono per i seni paranasali tutti i fattori prognostici di vario tipo identificati per tutti i carcinomi della testa e del collo.

Si possono dividere in:

- 1- Fattori prognostici legati al paziente
- 2- Fattori prognostici legati al tumore
- 3- Fattori prognostici legati alla terapia.

Fattori prognostici legati al paziente

-età: l'età media di questi tumori è di 63 anni. In alcuni studi non sembra influenzare la prognosi, mentre ⁽⁷²⁾ in altri più recenti e condotti con metodi statistici più sofisticati l'età più avanzata si è rivelata un fattore prognostico negativo. ^(73, 74)

-sesso: è ritenuto un sicuro fattore di rischio essendo il sesso maschile colpito 4 volte di più del sesso femminile, con un rapporto di 10/1 in età giovane. ^(75,76) Non viene ritenuto invece come fattore prognostico a malattia instaurata e consolidata.

-abitudini di vita: il permanere, a malattia insorta, di abitudini voluttuarie (es. fumo e alcool) o il mantenimento di attività lavorative a rischio sono sicuramente fattori prognostici negativi ⁽⁷⁷⁾

-stato nutrizionale: esso si correla sicuramente con deficit immunitari. Uno scadimento nutrizionale dovuto all'ipoalimentazione o a fenomeni cachettici di origine neoplastica, si correla pertanto con un aumento della progressione e diffusione tumorale.

-patologie concomitanti: la comorbidità (riguardante soprattutto le broncopatie croniche e le epatopatie croniche) è un sicuro fattore prognostico negativo sulla sopravvivenza.

-stato socioeconomico: è stato dimostrato che uno livello socio-economico più elevato si correla con una migliore prognosi.

-complicanze post-operatorie: la presenza di complicanze post-operatorie si correla con un decorso più sfavorevole della malattia ⁽⁷⁸⁾.

-trasfusioni di sangue intero (pre, intra e post-operatorie): nei lavori che hanno trattato l'argomento c'è una sicura significatività statistica su casistica numericamente adeguata degli effetti negativi delle trasfusioni sulla sopravvivenza ⁽⁷⁸⁾.

-anemizzazione: uno stato anemico si correla con una peggiore prognosi. Si può ipotizzare che l'impegno delle cellule midollari a correggere lo stato anemico coinvolga, in senso negativo, gli elementi immunocompetenti responsabili dell'immunosorveglianza.

-ritardo diagnostico e terapeutico: una neoplasia diagnosticata in stadio più avanzato ha ovviamente minori probabilità di guarigione ⁽⁷⁹⁾.

Fattori prognostici legati al tumore

1) stadio T : esiste una serie numerosa di dati, statisticamente significativi riguardo i carcinomi naso-sinusal, sul fatto che al crescere dello stadio T si evidenzia un concomitante peggioramento della sopravvivenza ed un aumento del numero delle recidive ^(80, 81, 82). Possiamo affermare che il passare da T1 a T4 si accompagna sicuramente, in tutti i carcinomi squamo cellulari della testa e del collo, ad un peggioramento della prognosi.

2) stadio N : è concetto ormai storico e consolidato che la presenza di metastasi linfonodali si correla con una prognosi sfavorevole e quindi rappresenta un fattore prognostico negativo: è questo il segno del crollo delle prime difese immunitarie e del superamento dei limiti anatomici dell'organo colpito da neoplasia. In particolare il superamento istologico della capsula linfonodale da parte del tumore è segno particolare di prognosi infausta ⁽⁸³⁾.

3) caratteristiche istologiche del T : lo studio istologico con le colorazioni classiche del tumore può fornirci alcune evidenze utilizzabili per la prognosi

a) Grading. L'OMS prende in considerazione il grado di cheratinizzazione, il numero di perle cornee, l'attività mitotica, la presenza di giunzioni intercellulari, il rapporto nucleo-citoplasma e la presenza di cellule anaplastiche, per definire 4 gradi di grading. La scarsa differenziazione è stata verificata come fattore prognostico negativo nei tumori nasosinusali ⁽⁸⁴⁾ e del cavo orale ⁽⁸⁵⁾ , mentre è risultata dubbia (con dati contrastanti) nei tumori del cavo rinofaringeo, dell'orofaringe, della laringe.

Tab. X – Grading istopatologico

Grading istopatologico (TNM V ed-1997 U.I.C.C.)	
GX	Il grado di differenziazione non può essere accertato
G1	Ben differenziato
G2	Moderatamente differenziato
G3	Scarsamente differenziato
G4	Indifferenziato

b) Altre caratteristiche istologiche. E' dato ormai consolidato che gli aspetti istologici verrucosi (carcinoma verrucoso) si correlano con una prognosi discreta e quindi possono giustificare trattamenti chirurgici decisamente conservativi (es. uso del laser). Il carcinoma con aspetti prevalentemente basaloidi ha invece prognosi decisamente peggiore.

Altre caratteristiche istologiche per cui esistono evidenze di un sicuro significato prognostico sono:

-Embolizzazione intravasale da parte di cellule tumorali (E+) della quale è stato dimostrato in analisi multivariata il cattivo significato prognostico ^(86,87).

-Invasione perineurale, che è rappresentata dall'invasione da parte del tumore della guaina del perinervio, che normalmente è barriera insuperabile per le cellule tumorali. Il suo superamento è segno di grande aggressività del tumore e di un rischio significativamente aumentato di metastatizzazione linfonodale ^(87,88).

-Presenza di cellule immunocompetenti: è ormai assodato che l'organismo reagisce contro l'insorgenza e la progressione di ogni tumore con l'immunosorveglianza cui sovrintendono cellule immunocompetenti effettrici (APC, linfociti T citotossici, cellule NK, ADCC) e meccanismi effettori umorali (anticorpi citotossici). E' stato dimostrato anche che man mano che il tumore cresce, le potenzialità citotossiche degli elementi immunocompetenti vengono inibite da meccanismi soppressori.

4) Tempo di recidiva: è stato attribuito, con grande significatività statistica, un significato prognostico negativo nei confronti della sopravvivenza al tempo di recidiva: tempi di recidiva brevi sono correlati con una peggiore sopravvivenza. ⁽⁸⁹⁾

I fattori prognostici legati alla terapia si dividono a loro volta in:

Fattori prognostici legati alla chirurgia

Una chirurgia scorretta o inadeguata che causa un controllo locale imperfetto e conseguente presenza di margini positivi per tumore è un fattore prognostico tra i più negativi ^(90, 91, 92, 93).

Sono stati identificati alcuni punti chiave:

1) L'importanza dell'orientamento del pezzo chirurgico, che richiede una stretta collaborazione tra patologo e chirurgo, con definizione precisa di criteri standard che devono essere sempre seguiti.

2) Il problema della retrazione dei tessuti post-fissazione (che può variare dal 15 al 40%) che porta alla sottostima della distanza del tumore dai margini e della dimensione della

neoplasia: si può dire che una distanza tra tumore e margini di 5 mm valutata su un preparato istologico corrisponde in vivo a 8-9 mm.

3) Il problema delle modalità di prelievo, che devono essere definite da patologo e chirurgo, individuando anche un numero standard di prelievi

4) La definizione del concetto di “close margin”, per indicare un margine che, pur essendo negativo, è molto vicino al tumore. Loree e Strong (1990) ⁽⁹⁴⁾ hanno osservato ugual numero di recidive quando i margini distano dal tumore meno di 0,5 mm e quando sui margini compare displasia media o grave.

5) L'importanza del tipo di positività del margine: presenza di “avanzamento frontale” del tumore, o di “infiltrazione”: quest'ultimo si accompagna ad un maggior numero di recidive.

6) L'importanza di un uso sistematico di diagnosi al congelatore in extemporanea, che hanno dimostrato una concordanza con la diagnosi istologica tradizionale pari al 96-98%

Fattori prognostici legati alla radio/chemio terapia

Una serie di studi degli ultimi 20 anni ha permesso di razionalizzare, con discreta precisione le indicazioni alla Radioterapia e alla Radiochemioterapia, di perfezionare la tecnologia, le dosi radianti, i tipi di farmaci con le relative dosi. E' chiaro che un'indicazione radioterapica o radio-chemioterapica scorretta e un'inadeguatezza di tecnica o di dose, porta ad un difettoso controllo locale e diventa pertanto un fattore prognostico negativo.

FATTORI PROGNOSTICI DELLE NEOPLASIE DEL DISTRETTO

NASO-SINUSALE

Esistono alcune evidenze specifiche, in materia di fattori prognostici, che riguardano i tumori naso-sinusali. Molto importante è il discorso di alcune sottosedì coinvolte: le neoplasie della parete antero-inferiore del seno mascellare (la vecchia infrastruttura) si propagano solo tardivamente verso le strutture nobili soprastanti e quindi hanno prognosi più favorevole, esattamente il contrario invece avviene per i tumori dell'etmoide e dello sfenoide.

Lo stadio di T e lo stadio di N, che sono fattori prognostici universali per gli HNSCC (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma), qui assumono un significato decisamente più importante. Uno stadio IV (che si accompagna ad invasione endocranica) e un N+ (che normalmente è raro in questi tumori) si accompagnano quasi sempre ad una prognosi infausta, in modo più rilevante rispetto a quanto avviene in altre sedi ⁽⁹⁵⁾. L'invasione della dura madre comprovata dal punto di vista istopatologico è associata a un elevato tasso di recidive locali.

Ci sono alcuni dati, peculiari della sede che riguardano il significato prognostico di alcuni aspetti istologici (che qui sono molto più multiformi rispetto agli altri distretti cervico-facciali). Il carcinoma indifferenziato, specie se etmoidale ⁽⁹³⁾ ha una prognosi pessima, mentre il carcinoma adenoidocistico ha una sopravvivenza più lunga (talora a 10 anni) per cui in questi casi l'essere liberi da malattia a 5 anni non ha significato di guarigione avvenuta. ^(96, 97, 98, 99, 100) Particolarmente importante in questa sede è il ritardo diagnostico e terapeutico. Essendo i tumori iniziali spesso asintomatici o contraddistinti da sintomi nasali aspecifici, molto spesso la prima diagnosi avviene in stadio avanzato, con quelle conseguenze gravi per la prognosi di cui abbiamo già parlato.

Risulta inoltre particolarmente annoso il problema dei margini chirurgici, vista la grande complessità anatomica della regione, che rende più difficile la valutazione visiva dell'exeresi chirurgica e lo studio istopatologico dei margini liberi da malattia.

ADENOCARCINOMA

Istopatologia

L'adenocarcinoma è una neoplasia maligna epiteliale caratterizzata dalla presenza di strutture ghiandolari. Gli adenocarcinomi della mucosa naso-sinusale derivano da cellule colonnari dell'epitelio respiratorio e dalle ghiandole siero mucose distribuite nell'epitelio.

L'incidenza degli adenocarcinomi nel contesto delle neoplasie naso-sinusali è generalmente compresa tra il 4% e il 7% ^(101, 102, 103), con punte fino a circa il 50% in casistiche selezionate, in regioni ad alta densità di lavoratori del legno ⁽¹⁰⁴⁾.

La sede di origine più frequente è la porzione superiore delle fosse nasali o il labirinto etmoidale.

Il sesso maschile è colpito con maggiore frequenza, con un rapporto M/F che va da 1,5 : 1 a 18: 1. Tale squilibrio è più accentuato nelle casistiche in cui è stata riscontrata una correlazione con la lavorazione dei legni duri. La maggiore incidenza per decade si osserva tra la quinta e la settima con un'età media lievemente più alta per le forme a basso grado di malignità.

Genetica

Recenti studi Danesi in accordo con Saber ⁽¹⁰⁵⁾ dimostrano un ruolo, seppur limitato, nella patogenesi delle neoplasie naso-sinusali rappresentato dalla mutazione del K-ras. Questa mutazione è presente nel 10-15% degli adenocarcinomi naso-sinusali di tipo intestinale.

La mutazione di P-53 è stata riscontrata in 18-44% dei casi ^(106, 107) ed è frequentemente associata alla metilazione dei promotori di p14(ARF) e di p16(INK4a) nelle neoplasie dei soggetti esposti professionalmente alle polveri di legno ⁽¹⁰⁶⁾. Sono state riscontrate, inoltre, altre alterazioni geniche tra cui la perdita di eterozigosi (LOH) su cromosoma 17p13 e 9q21 ⁽¹⁰⁸⁾.

Gli adenocarcinomi naso-sinusalì vengono suddivisi in due principali categorie: e adenocarcinoma di tipo non intestinale e adenocarcinoma di tipo intestinale (ITAC).

L'adenocarcinoma di tipo non intestinale è suddiviso in due sottotipi istologici: a basso grado e ad alto grado. A differenza dell'adenocarcinoma di tipo intestinale la variante non intestinale non è correlata a fattori di rischio occupazionali.

L'adenocarcinoma non intestinale a basso grado può essere circoscritto o invadere i tessuti circostanti. Dal punto di vista morfologico è caratterizzato da un pattern di crescita sia tubulare che papillare e presenta numerose ghiandole uniformi strettamente adese l'una all'altra con piccole e sporadiche interposizioni di tessuto stromale. L'epitelio può apparire monostratificato o pseudo stratificato. Nel primo caso è formato da cellule cuboidali o colonnari con nuclei basali, mentre, nel secondo caso la distribuzione dei nuclei suggerisce una perdita della polarità delle cellule. Il pleomorfismo è moderato o assente.

L'adenocarcinoma non-intestinale ad alto grado ha un pattern di crescita solida, cui si possono interporre strutture ghiandolari o papillari. Questo tumore è caratterizzato da un marcato pleomorfismo cellulare, un'alta attività mitotica, atipie e necrosi.

ADENOCARCINOMA DI TIPO INTESTINALE(ITAC)

Il secondo tipo di adenocarcinoma sinonasale è stato chiamato adenocarcinoma di tipo intestinale (ITAC) ed è responsabile di meno del 4% delle neoplasie totali della regione naso-sinusale. ⁽¹⁰⁹⁾

L' adenocarcinoma di tipo intestinale comprende un gruppo di neoplasie con caratteristiche epidemiologiche e morfologiche del tutto peculiari. Gli ITAC della cavità nasale e dei seni paranasali possono verificarsi sporadicamente o sono associati all'esposizione professionale a legno duro e polveri di cuoio⁽¹¹⁰⁾. L'esposizione a polveri di legno e cuoio aumenta il rischio di adenocarcinoma di 500 volte ^(111, 112). I risultati di numerosi studi hanno suggerito differenze cliniche tra ITAC che si presentano in soggetti con esposizione professionale alla polvere e ITAC che si presentano sporadicamente. Infatti, i tumori correlati all'esposizione professionale colpiscono gli uomini nell'85-90% dei casi, mostrando una forte tendenza a insorgere nei seni etmoidi⁽¹¹³⁻¹¹⁵⁾.

L'ITAC sembra essere preceduto dalla metaplasia intestinale della mucosa respiratoria, indotta da polvere di legno duro, polvere di cuoio e altri agenti sconosciuti, che è accompagnata da un passaggio a un fenotipo intestinale.

E' molto aggressivo localmente anche nelle forme meglio differenziate che ricordano una mucosa intestinale normale provvista di muscolaris mucosae, con villi ben formati rivestiti da cellule globose, assorbenti, di Paneth e argentaffini⁽¹¹⁶⁾.

Kleinsasser e Schroeder ⁽¹¹⁷⁾ hanno suddiviso l'adenocarcinoma di tipo intestinale in: tubulo-papillare (ben differenziato, moderatamente e scarsamente differenziato), a cellule globose, a cellule ad anello con castone e in forme miste o transizionali.

L'adenocarcinoma naso-sinusale di tipo intestinale tubulo-papillare ben differenziato, mostra un pattern di crescita prevalentemente papillare con occasionali strutture tubulari e cellularità mono o pseudo-stratificata con nuclei lievemente ipercromici e nucleoli cospicui che ricordano la morfologia degli adenomi villosi dell'intestino crasso. (fig. 1)

Nelle forme moderatamente e scarsamente differenziate si osserva un aumento della componente tubulare, del pleomorfismo cellulare, delle atipie citonucleari e delle mitosi che ripropongono gli aspetti dell'adenocarcinoma intestinale di tipo usuale. (fig. 2)

La variante a cellule globose è caratterizzata dalla presenza di abbondante muco extracellulare, sedimentato da tralci fibrosi rivestiti di elementi neoplastici colonnari o globosi, che possono essere presenti anche nei laghi di muco. (fig. 3)

Il terzo gruppo (cellule ad anello con castone) mostra una caratteristica cellulare neoplastica con nuclei ipercromici, compressi alla periferia da mucine intracitoplasmatiche, dispersa in piccoli aggregati su uno sfondo di muco. (fig. 4)

Le forme miste sono una commistione dei quadri morfologici precedentemente descritti. Tutti gli ITAC sono distinguibili dalle forme metastatiche di adenocarcinoma di origine intestinale per la intensa positività alla CK 7 ⁽¹¹⁸⁾.

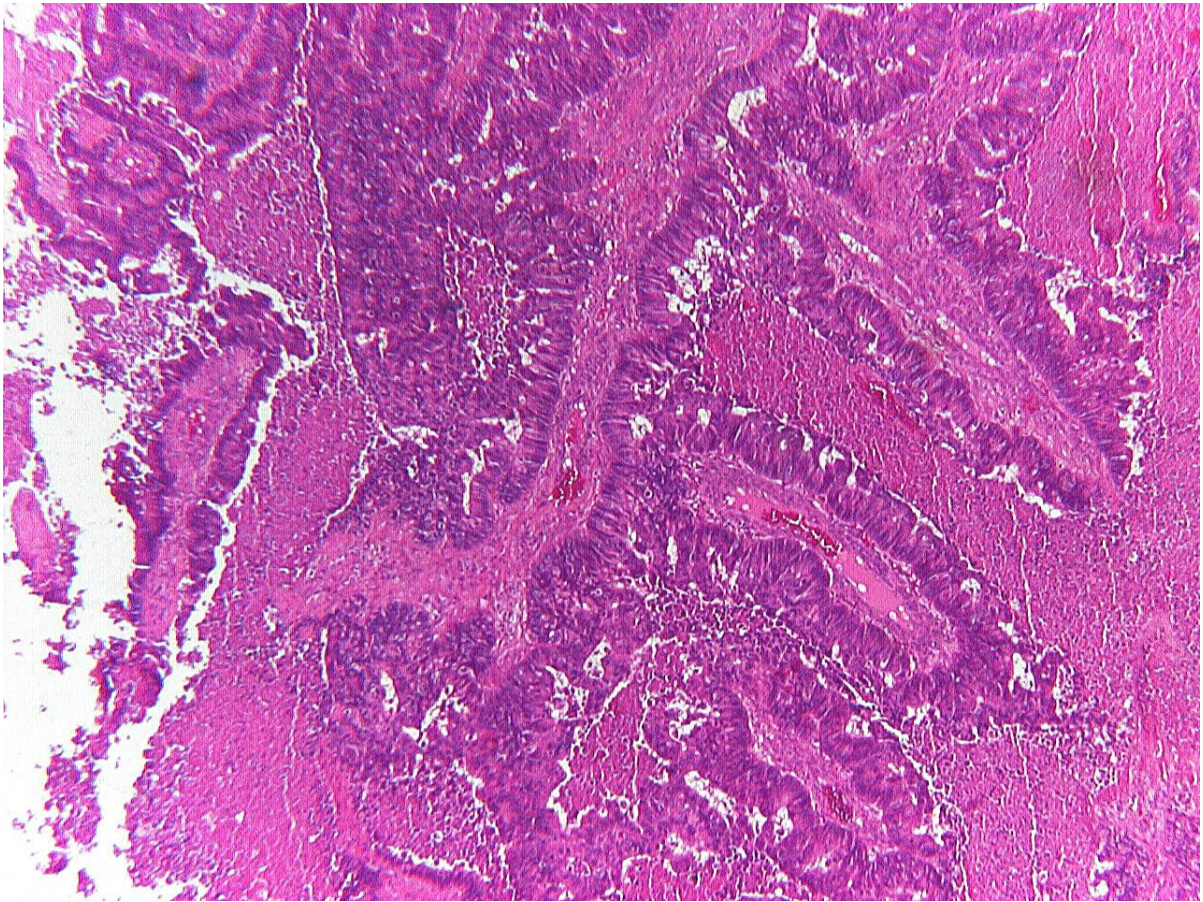


Fig. 1 – Adenocarcinoma di tipo intestinale tubulo- papillare moderatamente differenziato (G2).

Si notano aree di necrosi sulla sinistra. Ematossilina-eosina 20x.

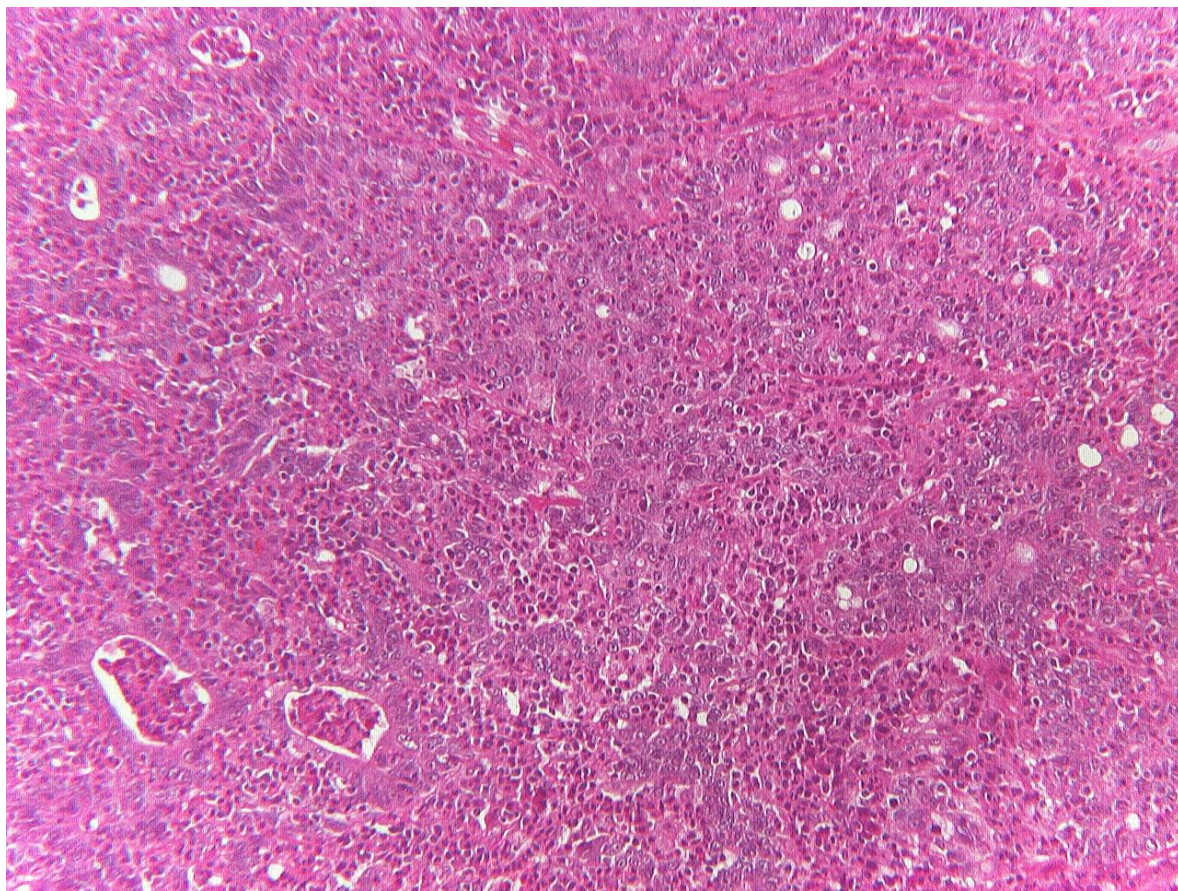


Fig. 2 - Adenocarcinoma di tipo intestinale scarsamente differenziato G3 con intensa componente infiammatoria acuta e cronica intra e peritumorale. Ematossilina-eosina 20x

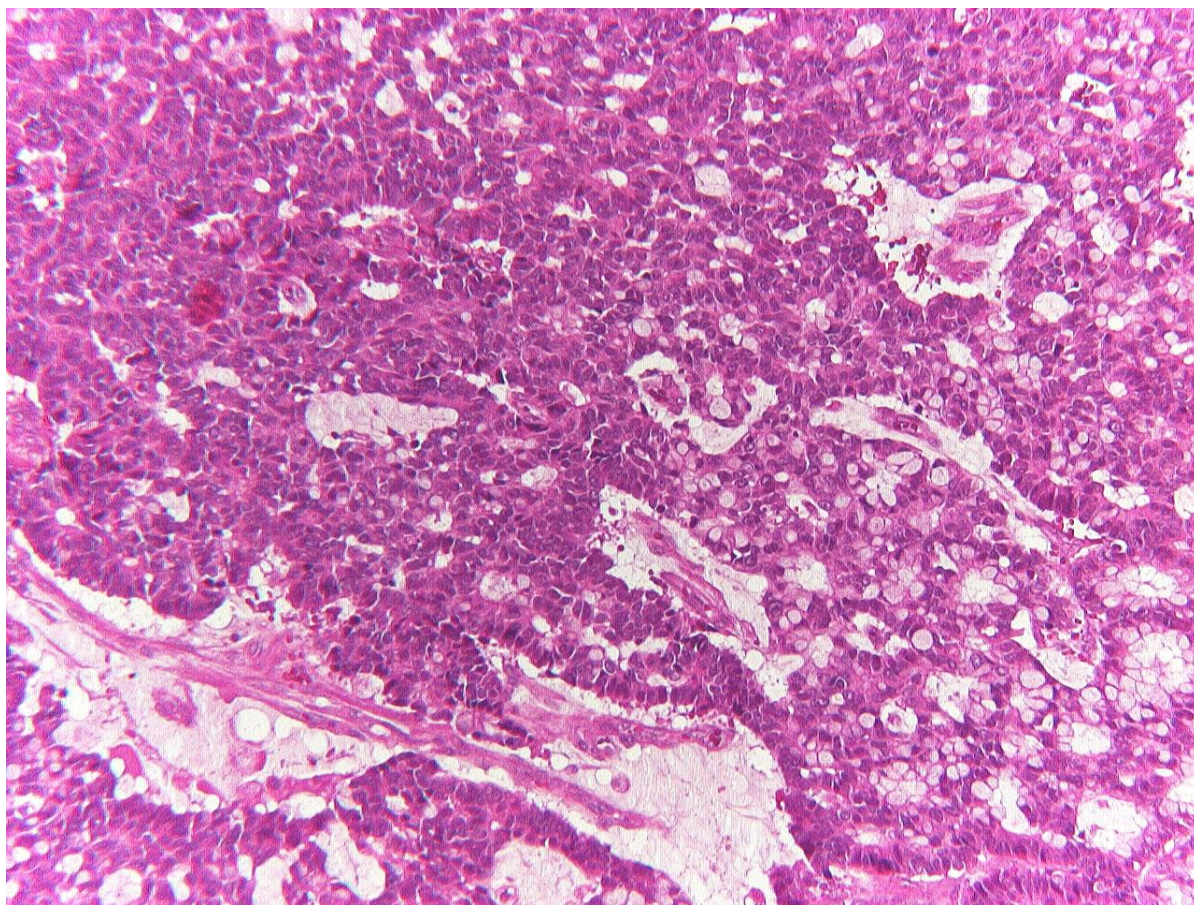


Fig.3 – Adenocarcinoma di tipo intestinale ben differenziato (G1) con una componente mucinosa.
Ematossilina-eosina 20x

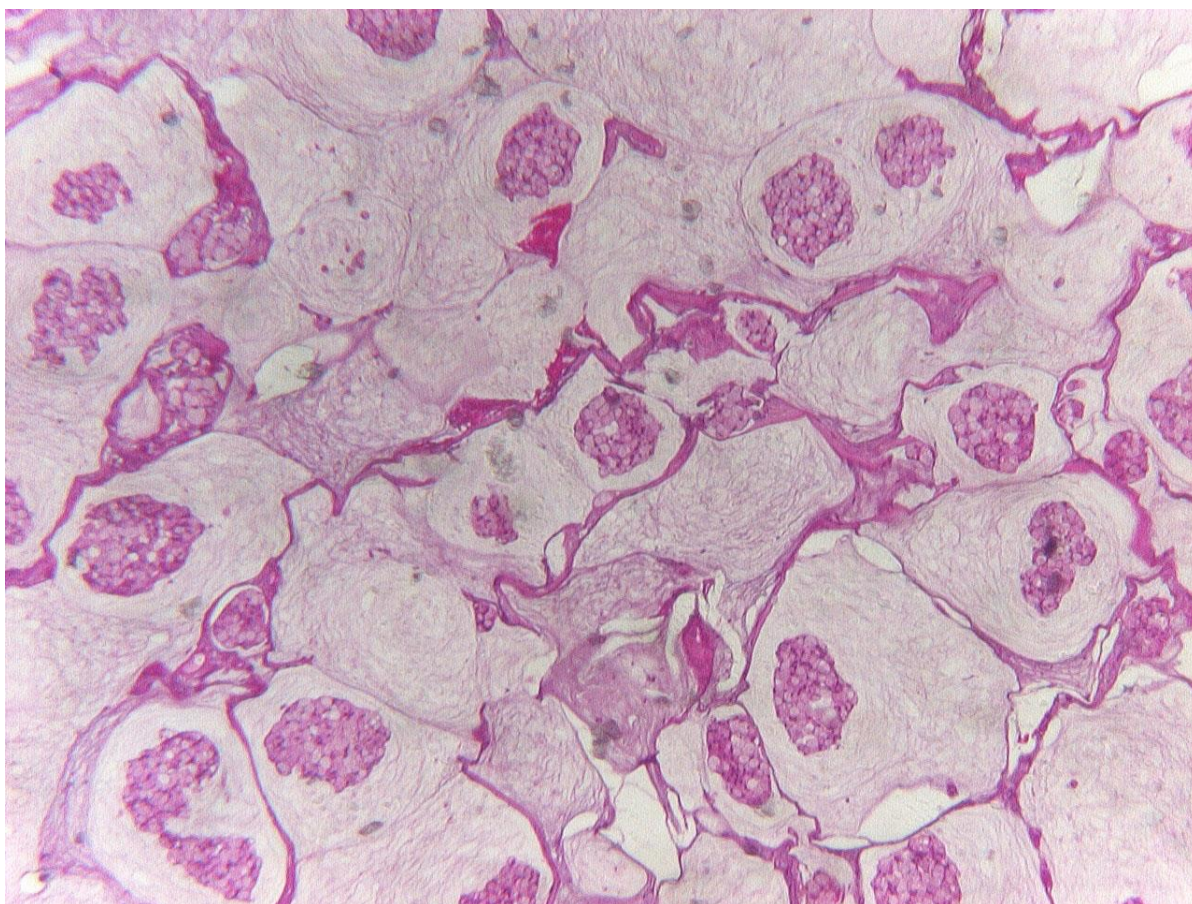


Fig. 4 - Adenocarcinoma di tipo intestinale a prevalente componente mucinosa. Ematossilina-eosina 16x

Fattori prognostici

Gli ITAC sono tumori aggressivi caratterizzati da frequenti recidive locali, bassa incidenza di metastasi a distanza e una mortalità complessiva di circa il 53% ⁽¹¹⁵⁾

La classificazione istopatologica e la classificazione T del TNM sembrano essere indicatori prognostici significativi ^(114, 119,120) La chirurgia combinata con radioterapia postoperatoria e, in alcuni casi, con chemioterapia adiuvante è considerata il trattamento standard. ⁽¹²¹⁾

La stadiazione clinica non ha un significato prognostico particolarmente significativo fatta eccezione per i tumori molto estesi (T4 sec. AJCC). ⁽¹²²⁾

Il sottotipo istologico assume maggiore significato marcando una netta differenza tra le sopravvivenze a 5 anni tra i singoli sottotipi ^(117, 122).

Tab. XI - Classificazione e sopravvivenza degli ITAC

Kleinsasser e Schroeder (20)	Sopravvivenza a 3 anni
Tubulo papillare I	82%
Tubulo papillare II	54%
Tubulo papillare III	36%
A cellule globose	48%
A cellule ad anello con castone	
Misto	71%
I = ben differenziato	
II = moderatamente differenziato	
III = scarsamente differenziato	

Le mutazioni di K-Ras o H-Ras, come l'espressione di c-erbB-2, sono associati ad un comportamento più aggressivo del tumore ^(123,124).

Sebbene alcuni dei classici fattori prognostici continuino ad essere di grande utilità nel predire il comportamento clinico degli ITAC, non è ancora chiaro perché alcuni pazienti con ITAC abbiano una prognosi migliore rispetto ad altri con lo stesso tipo di lesione in termini di caratteristiche istologiche e stadio clinico.

I parametri patologici della clinica convenzionale non riflettono accuratamente l'esito clinico dei pazienti con questo tumore. Pertanto, vi è l'urgente necessità di nuovi fattori prognostici in grado di prevedere l'esito nei pazienti affetti da ITAC.

miRNA

I **miRNA** sono piccole molecole endogene di RNA non codificante, a singolo filamento di 20-22 nucleotidi che fanno parte di una grande rete di geni regolatori. Hanno un ruolo importante nella regolazione dell'espressione di geni implicati nella differenziazione, proliferazione ed apoptosi cellulare. La più nota attualmente è una regolazione post-trascrizionale.⁽¹²⁵⁾ Ad oggi sono identificati centinaia di miRNA umani, 940 secondo la più recente versione di miRBase, sia mediante un approccio sperimentale sia mediante analisi computazionale. Tutti i miRNA scoperti vengono infatti puntualmente depositati nel Sanger centre miRBase database ⁽¹²⁶⁾, un vero e proprio registro dei miRNA, in cui sono annotate tutte le loro caratteristiche. In tale database sono presenti anche le informazioni che riguardano la genomica dei miRNA, ovvero il modo in cui i loro geni sono organizzati sui cromosomi umani. In particolare, i geni codificanti i miRNA sono distribuiti su tutti i cromosomi, eccetto il cromosoma Y, e nel 50% dei casi geni per differenti miRNA sono localizzati in loci adiacenti, organizzandosi in veri e propri clusters, ad esempio il cluster costituito dai miRNA hsa-let-7a-1, hsa-let-7f-1 e hsa-let-7d presente nel cromosoma 9.

Nei vertebrati i miRNA costituiscono circa l'1% di tutti i geni. Essi rappresentano una classe di small RNAs unitamente agli Short interfering RNA (siRNA), MicroRNA (miRNA), Piwi RNA (piRNA), Trans-acting siRNA (tasiRNA), Small-scan RNA (scnRNA) e Repeat-associated siRNA (rasiRNA). Le prime due molecole sono ampiamente presenti in natura e derivano da precursori a doppio filamento, i PiwiRna sono molto presenti negli animali e sembrano derivare da precursori a singolo filamento, anche se per questi si hanno poche informazioni.

I microRNA sono, per la maggior parte, ampiamente caratterizzati nelle piante e nei nematodi (dove per la prima volta vennero osservati) e differiscono per sequenza, quantità, pattern di espressione e localizzazione genomica. La maggior parte dei geni che codificano per i microRNA hanno isoforme multiple (paraloghi) che sono probabilmente il risultato della duplicazione genica. Il genoma umano

possiede 12 loci per la famiglia del miRNA let-7. I geni paraloghi hanno spesso una sequenza identica nella porzione 5' relativa alle posizioni nucleotidiche 2-7. Poiché 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 miRNA importante per l'appaiamento con l'mRNA bersaglio, e poiché questi miRNA hanno spesso pattern di espressione differenti, membri della famiglia con la stessa 'seed sequence' possono avere ruoli distinti in vivo. Approssimativamente il 50% dei loci dei miRNA nei mammiferi sono in stretta vicinanza con altri miRNA e spesso questi 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 miRNA sono localizzati in regioni introniche di TU non codificanti, mentre il 10% è situato in regioni esoniche⁽¹²⁷⁾ (**Figura 5**). I loci dei miRNA 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.

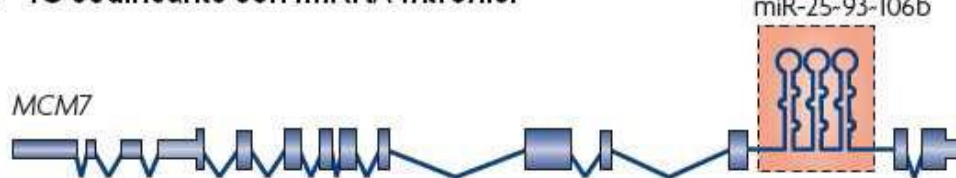
a TU non codificante con miRNA intronici



b TU non codificante con miRNA esonici



c TU codificante con miRNA intronici



d TU codificante con miRNA esonici



Fig. 5.

I microRNA vengono codificati sottoforma di lunghi trascritti primari caratterizzati da una complessa struttura a forcina (pri-miRNA) (**Fig.6**) e sono processati nel nucleo dalla RNasi III ⁽¹²⁸⁾ Drosha a formare un microRNA precursore (pre-miRNA) della lunghezza di 70-80 nucleotidi⁽¹²⁹⁾. Queste molecole precursori vengono esportate, attraverso un meccanismo mediato dall'Esportina 5, dal nucleo al citoplasma dove un ulteriore step di maturazione mediato dall'RNasi II Dicer ⁽¹³⁰⁾ 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 un enzima con attività di elicasi. I miRNA vengono trascritti da geni non codificanti proteine che hanno un proprio locus genico oppure contenuti all'interno di regioni introniche di altre sequenze codificanti^(131, 132) Ad oggi sono stati individuati e validati sperimentalmente 940 miRNA umani, come riportato dal database dei microRNA, miRBase.

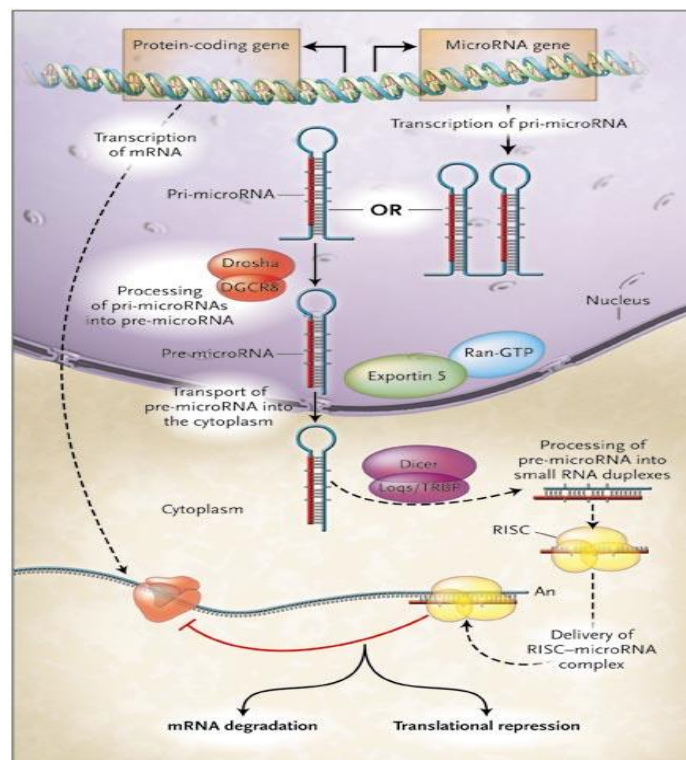


Fig.6.

Molti di essi sono differentemente espressi nel corso dello sviluppo e del differenziamento e la modulazione specifica di diversi miRNA è stata di recente associata ad alcune forme tumorali umane⁽¹³³⁾. Queste osservazioni hanno portato a postulare che i miRNA possono essere considerati come una nuova classe di oncogeni o oncosoppressori⁽¹³⁴⁾.

Le ultime scoperte, basate sull' espressione dei miRNA nei tessuti neoplastici e anche nella controparte tissutale sana, hanno evidenziato che l'espressione dei miRNA possono distinguere un tessuto neoplastico da quello sano. Questo è stato evidenziato nel tumore di mammella, polmone, pancreas, fegato e nelle leucemie ^(135, 136, 137, 138, 139).

E' stato evidenziato che una deregolazione d'espressione dei miRNA 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) ⁽¹⁴⁰⁾. Questi miRNA 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. Tra l'altro, alcuni specifici miRNA hanno già assunto un significato prognostico nel cancro del polmone e nella leucemia linfatica cronica^(141, 142, 143).

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⁽¹⁴⁴⁾.

Numerosi miRNAs sono stati associati a diverse neoplasie. Nel carcinoma prostatico, in cui figura il ruolo del miR-18a, fortemente sovraespresso nei tessuti patologici, agisce come miRNA oncogenic; la sua espressione si ritrova aumentata nel sangue periferico dei pazienti con carcinoma prostatico rispetto ai pazienti con iperplasia prostatica benigna (BPH) e soggetti sani ⁽¹⁴⁵⁾. Nel carcinoma mammario miR-21 sembra promuovere la proliferazione e lo sviluppo di metastasi⁽¹⁴⁶⁾, al contrario diversi miRNAs sembrano avere opposto ruolo di inibizione della crescita delle cellule tumorali, come accade per miR-433⁽¹⁴⁷⁾.

In campo ORL studi precedenti hanno dimostrato l'espressione di miR-21, miR-34c e let-7a nel tessuto neoplastico laringeo. ⁽¹⁴⁸⁾.

Si procede ora ad un'analisi più specifica dei miR-34, miR-449 e miR-205, attori molecolari emersi in queste studio sperimentale.

MiR-34 e MiR-449

La famiglia miR-34/449 è composta da sei miRNA omologhi in tre loci genomici.

I microRNA 449 a,b,c (miR-449) sono potenti induttori di morte cellulare, arresto del ciclo cellulare e / o differenziazione cellulare. Tutti i membri di questo la famiglia di microRNAs sono in grado di mediare l'arresto del ciclo cellulare e apoptosi e potrebbero quindi contribuire alla soppressione del tumore. I meccanismi sottostanti comprendono la downregulation di istone acetil transferasi e attivazione consecutiva di p53, ma anche il targeting delle chinasi dipendenti dalla ciclina e loro partner di associazione. Pertanto, miR-34 e miR-449 forniscono un loop di feedback asimmetrico per bilanciare le attività E2F e p53.

L'espressione dominante di questi miRNAs negli epitelii multiciliati suggerisce un significato funzionale nella ciliogenesi. Due sistemi modello (embrioni di *Xenopus* e cellule umane in coltura) hanno rivelato che miR-449 è essenziale per lo sviluppo di epitelio ciliato ⁽¹⁴⁹⁾.

E' stato dimostrato che sia nel topo che nello *Xenopus*, le cellule multiciliate carenti di miR-34/449 (MCC) hanno mostrato 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 ⁽¹⁵⁰⁾.

Inoltre, secondo altri studi, miR-34/449 sembrano promuovere l'assemblaggio di una rete apicale di actina, necessaria per il corretto ancoraggio dei corpi basali. 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.⁽¹⁵¹⁾

MiR-205

Il miR-205 riveste un ruolo chiave nella biogenesi dell'epitelio ed è coinvolto nella regolazione dell'espressione di geni implicati nell'organizzazione epiteliale e dell'adesione cellulare⁽¹⁵²⁾.

Numerose evidenze indicano che il miR-205 funge da soppressore tumorale regolando numerosi geni. L'aumento del miR-205 in cellule di tumore alla mammella e alla prostata era in grado di inibire la crescita e l'invasione cellulare mediante la regolazione di numerose vie di segnale. Se da un lato il miR-205 è stato descritto come un oncosoppressore, dall'altra parte, il miR-205 è stato associato alla genesi tumorale. Tuttavia, contrariamente a quanto sopra affermato, secondo alcuni studi, il miR-205 può giocare un ruolo chiave nell'eziologia e iniziazione del processo tumorale promuovendo la progressione tumorale e la resistenza al trattamento chemioterapico⁽¹⁵³⁾. Elevati livelli di miR-205 sembrano infatti indurre indirettamente l'attivazione della AKT mediante la sotto-regolazione delle SHIP2 (SH2-containing phosphoinositide 5-phosphatase contribuendo alla patogenesi del carcinoma squamoso⁽¹⁵⁴⁾. Clinicamente, un'alta espressione del miR-205 si è rilevata associata ad una bassa sopravvivenza nel cancro all'endometrio, risultando, pertanto, un biomarcatore prognostico negativo⁽¹⁵⁵⁾. Inoltre, è stato riportato che il miR-205 è essenziale per la carcinogenesi del carcinoma nasofaringeo e che alti livelli di tale miRNA inducono radioresistenza in questo tipo di tumore⁽¹⁵⁶⁾.

MiR-205 può essere un promettente biomarcatore per il rilevamento, prevedendone la ricorrenza, di carcinoma polmonare⁽¹⁵⁷⁾.

Studi recenti hanno indicato che bassi livelli di let-7d e miR-205 nei pazienti con HNSCC sono correlati con una scarsa sopravvivenza. Let-7d e miR-205 sono soppressori del tumore e regolatori

della transizione epiteliale-mesenchimale (EMT). Tuttavia, non è chiaro se let-7d e miR-205 influenzino in maniera sinergica le cellule tumorali. ⁽¹⁵⁸⁾.

STUDIO SPERIMENTALE

SCOPO E DISEGNO DELLO STUDIO

Obiettivo del presente studio di coorte prospettico è quello di valutare il ruolo ed il possibile significato clinico-prognostico dell'espressione di specifici microRNAs nell' adenocarcinoma di tipo intestinale dei seni paranasali (ITACs).

MATERIALI E METODI

Popolazione di studio

Abbiamo effettuato uno studio di coorte prospettico su 31 pazienti affetti da adenocarcinoma nasosinusale di tipo intestinale (Intestinal Type Adenocarcinoma, ITAC) 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 -2017.

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 biotici adeguati alla valutazione;
- Follow-up minimo di 3 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 (resezione cranio-endoscopica o 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 biotico di tessuto tumorale e un adiacente campione di tessuto sano. Il campione biotico è stato immerso in soluzione fisiologica, immediatamente congelato a -20°C, e successivamente conservato a -80°C.

I pazienti con stadio avanzato e grading elevato (G3 - poco differenziati) sono stati sottoposti a radioterapia post-operatoria.

Il follow-up dei pazienti è stato effettuato con controlli endoscopici endonasali e di RMN del Massiccio Facciale ogni 6 mesi.

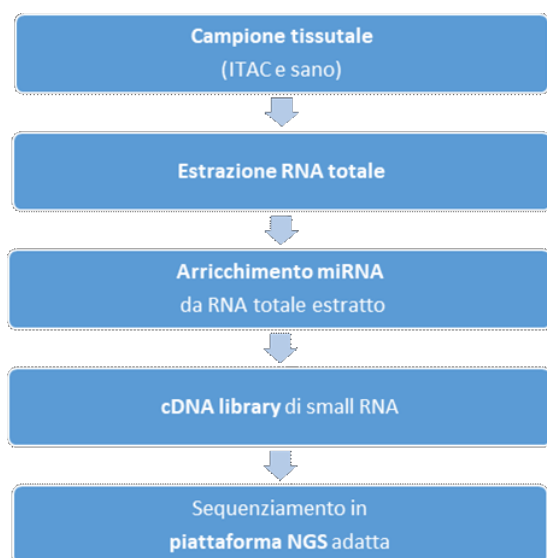
Tutti i pazienti hanno fornito il consenso informato e lo studio è stato condotto in accordo alla dichiarazione di Helsinki. I campioni tissutali processati secondo le indicazioni del Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria – Ospedali Riuniti di Ancona.

Analisi del miRnoma

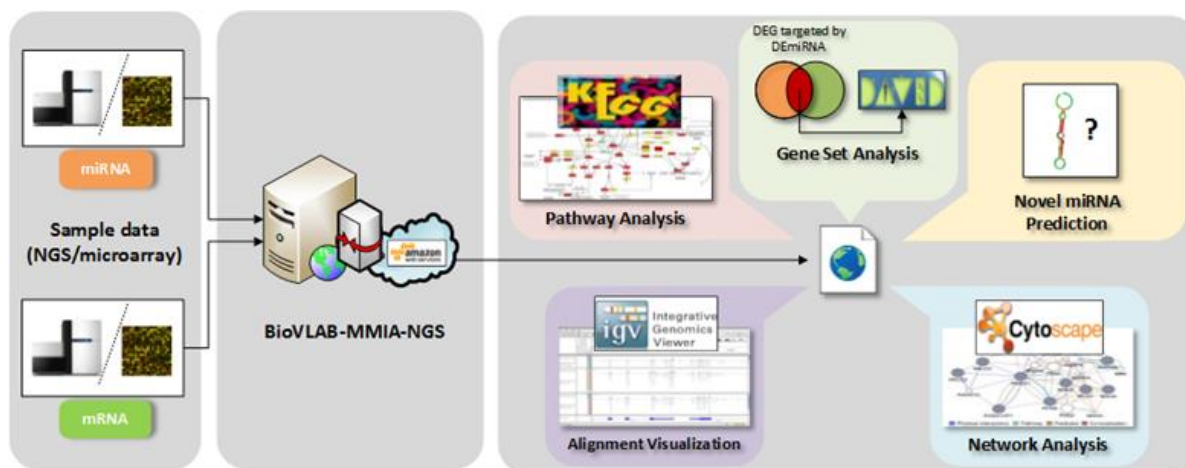
La prima fase dello studio è consistita nell'identificazione dei miRNAs deregolati nelle forme neoplastiche maligne in relazione alle forme benigne della cavità nasale. A tale scopo, tutti i

miRNAs (miRNoma) sono stati analizzati mediante la tecnologia NGS ‘Next Generation Sequencing’. L’analisi del miRNoma è stata eseguita in un sottogruppo di pazienti affetti da ITAC (n=5). I pazienti avevano un’età media di 69.8 ± 7.8 anni, 4 maschi e 1 femmina, dei quali 4 erano fumatori. Dai campioni biotici (sano e patologico) dei pazienti selezionati è stato estratto l’RNA totale utilizzando un kit commerciale RNeasy Mini Kit (Qiagen). Dopo aver analizzato la purezza e l’integrità dell’RNA totale mediante Qubit Flex Fluorometer (ThermoFisher), i campioni sono stati sequenziati con tecnologia NGS secondo le fasi illustrate nello **Schema 1**.

Schema 1. Rappresentazione grafica delle varie fasi per l’analisi miRNoma mediante 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 il linguaggio di programmazione 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 dei miRNAs mediante RT-PCR quantitativa

L'RNA totale è stato estratto da campioni di tessuto biotico 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). La 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 STATISTICA

I risultati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard o come mediana, quartile e intervallo di confidenza (CI). Le variabili categoriche sono state riportate come frazioni o percentuale e confrontate con il metodo chi-quadrato. I confronti tra i gruppi sono stati eseguiti utilizzando il t-test di Student a due code (due gruppi) o mediante l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dall'analisi post-hoc di Tukey (maggiore di due gruppi). La sopravvivenza globale (OS, overall survival) e la sopravvivenza libera da progressione di malattia (DFS, disease-free survival) sono state stimate usando le curve di Kaplan-Meier e il log-rank test è stato usato per valutare la differenza tra i sottogruppi. L'OS è stata definita come l'intervallo temporale tra la data della chirurgia e la data di morte, o alla data dell'ultimo follow-up dei pazienti vivi. La DFS è stata considerata come il tempo dalla chirurgia fino alla recidiva della malattia. L'analisi di regressione multivariata di Cox è stata utilizzata per valutare i fattori di predizione indipendenti di sopravvivenza. Fattori prognostici non significativi sono stati esclusi dal modello usando l'eliminazione a ritroso (Wald-Backward). 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

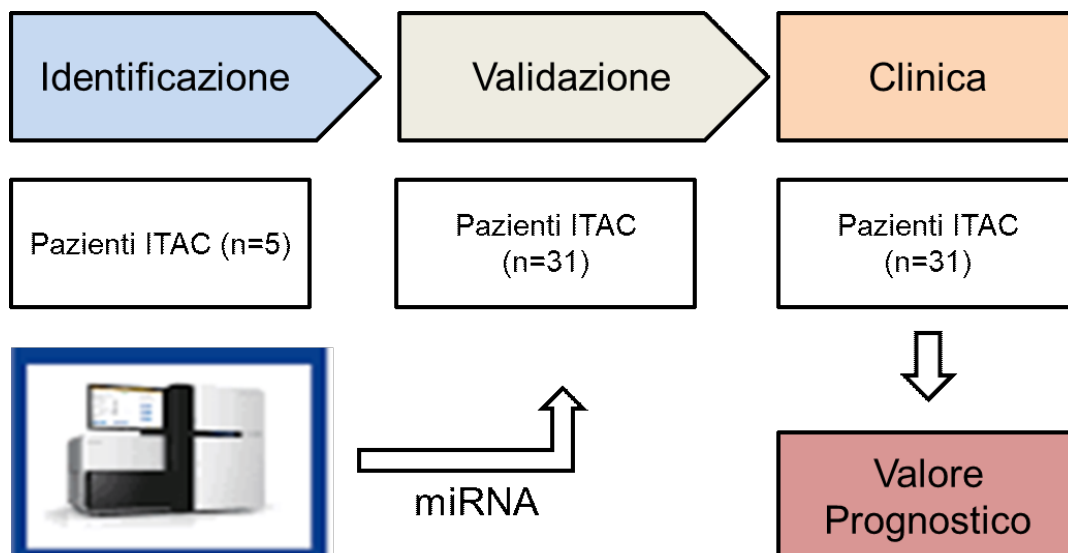
Per ordine espositivo, i risultati verranno esposti distinguendo:

Fase I: identificazione dei miRNAs che sono deregolati nel tessuto tumorale rispetto all'adiacente parte non-neoplastica.

Fase II: validazione dei miRNA selezionati

Fase III: valore clinico

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



Fase 1: Identificazione miRNAs

Dall'analisi di sequenziamento mediante la metodica NGS sono individuati 40 miRNAs deregolati nel tessuto tumorale rispetto alla corrispondente parte sana. Come mostrato in **Figura 7** la maggior parte dei miRNA deregolati erano sovra-espressi nel tessuto tumorale (62%) rispetto al tessuto sano.

Fig.7 Heat Map

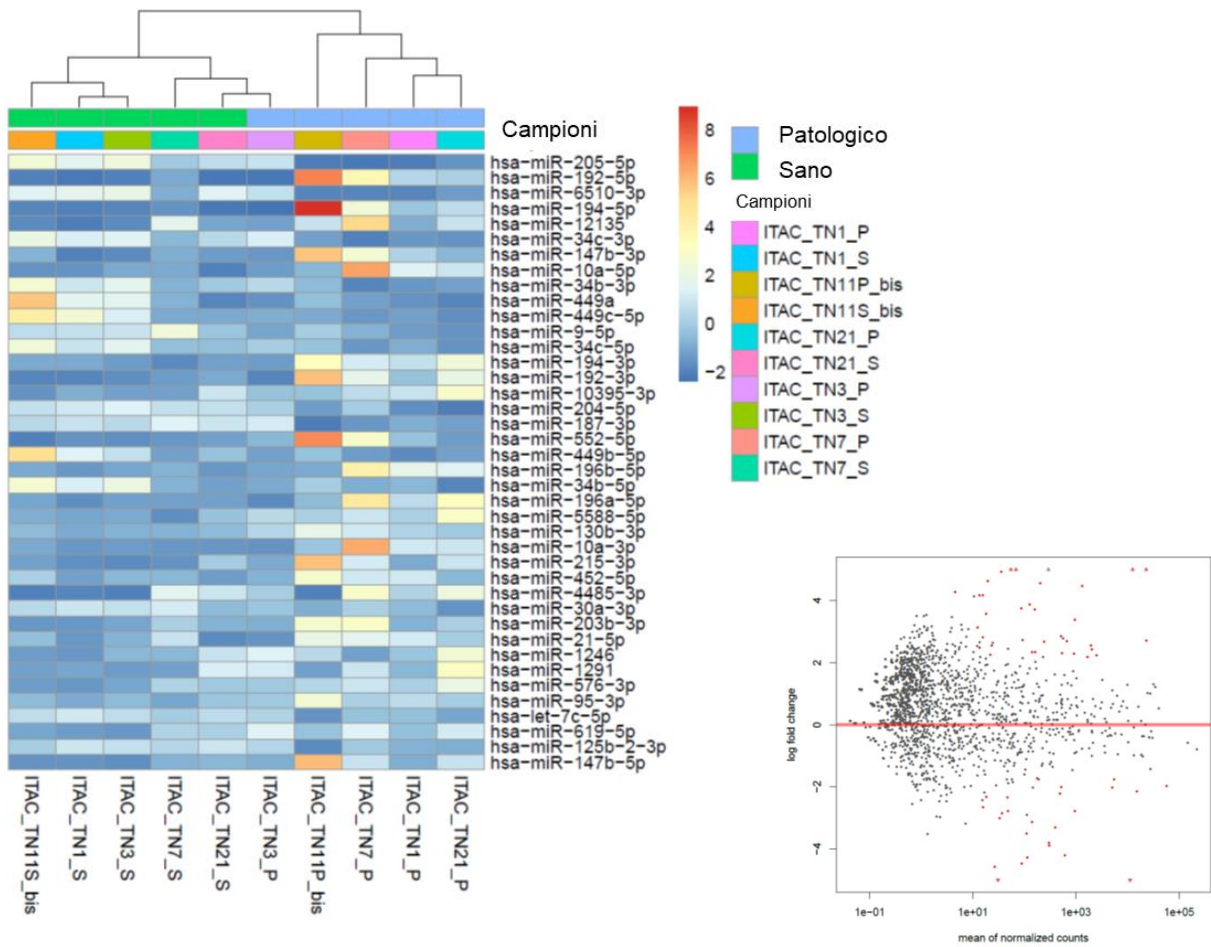


Fig.7. miRNA deregolati tra il tessuto patologico e tessuto sano di pazienti affetti da ITAC. Nella Heat Map vengono rappresentati i cambiamenti di espressione di tutti i miRNA trovati deregolati negli ITAC. Il rosso indica livelli aumentati mentre il blu indica livelli diminuiti. I miRNAs sotto o sovra espressi (Fold-Change) sono rappresentati nell'inserto di destra.

In base alla significatività, il numero delle volte sotto o sovra-espresso nel tessuto patologico rispetto alla parte sana (Fold-Cange), e in base alla formazione di gruppi caratteristici della patologia (clusters) sono stati selezionati quattro miRNAs (**Figura 8**)

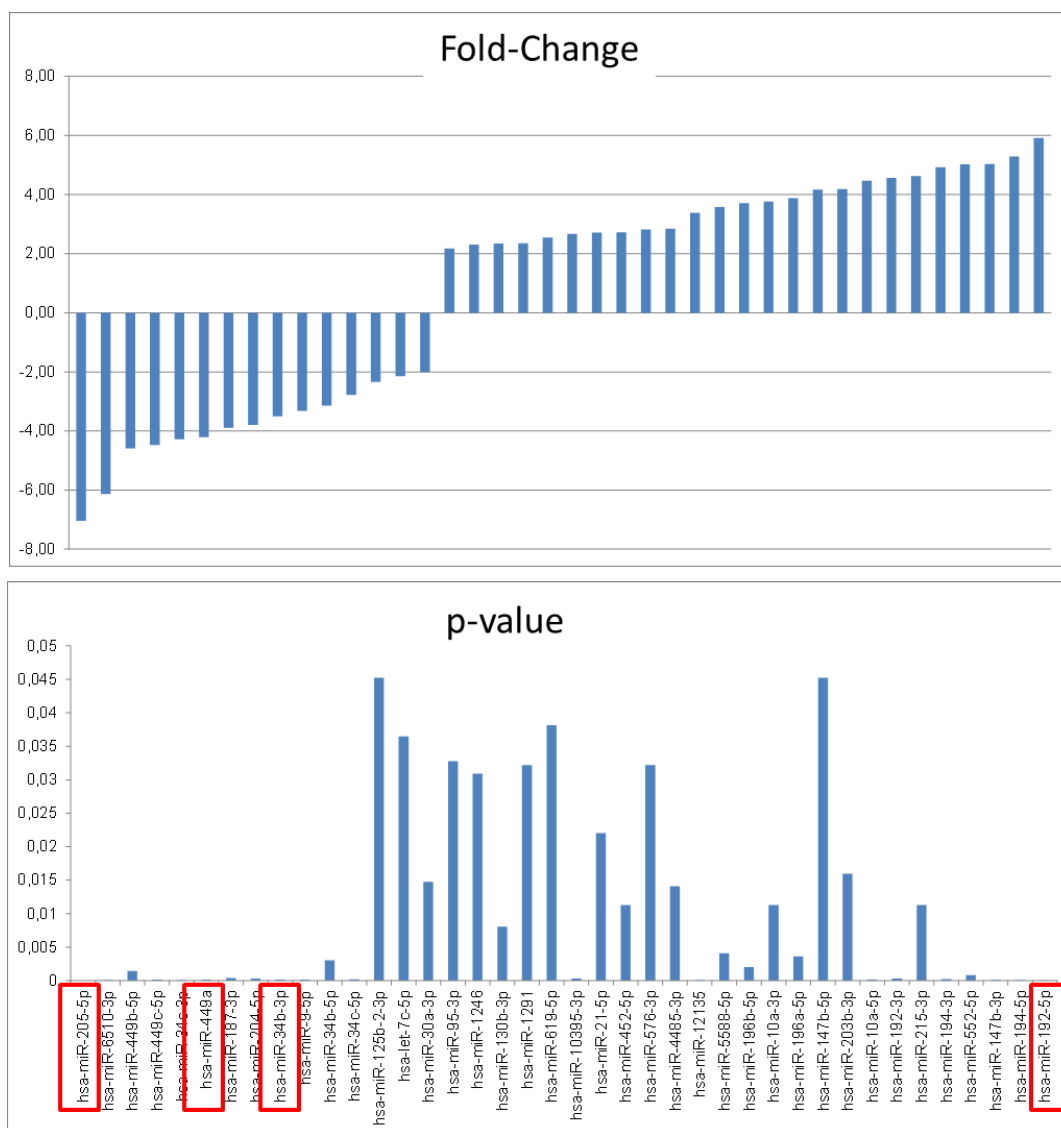


Fig.8 Distribuzione dei miRNAs sotto e sovra-espressi nel tessuto patologico rispetto al tessuto sano visualizzati come frequenza di espressione (Fold-Change) e significatività (p-value). I miRNAs con più bassi valori di ‘p’ sono più statisticamente significativi ($p < 0.05$).

Il miR-205 e il miR-192 sono stati selezionati in quanto erano significativamente sotto e sovra-espressi, inoltre sono stati valutati i clusters del miR-449 (miR-449a, miR-449b, miR-449c) e del miR-34 (miR-34b, miR-34c) in quanto sono stati descritti come due famiglie di miRNAs tipici delle cellule epiteliali ciliate caratteristiche della mucosa nasale (Mercey et al., 2017).

Fase II: Validazione dei miRNAs

I miRNA identificati mediante tecnica NGS, e successivamente selezionati, sono stati poi validati in una popolazione più ampia di pazienti affetti da adenocarcinoma di tipo intestinale naso-sinusale (Intestinal Type Adenocarcinoma, ITAC). La popolazione di studio era composta da 31 pazienti di età media di 65 ± 13 anni, e maggiormente rappresentata dal sesso maschile, pari al 93.5% dei casi. La maggior parte dei pazienti presentava un tumore in stadio avanzato (T3-T4) con ‘grading’ G2-G3. Circa l’11% ha presentato una recidiva con una mediana di sopravvivenza di 31.2 [6.7-296.20] mesi. Le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti sono riassunte riportate in **Tabella XII**.

Tabella XII. Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti

Popolazione ITAC	
Età (anni)	65 ± 13
Sesso (n/%)	
Maschio	29 (94)
Femmina	2 (6)
Fumo (n/%)	
No	14 (48)
Si	10 (35)
Ex-fumatore	5 (17)
Grading (n/%)	
G1	2 (7)
G2	24 (77)
G3	5 (16)
Stadio (n/%)	
T1	0
T2	8 (27)
T3	12 (40)
T4	10 (33)
Recidiva (n/%)	
No	17 (61)
Si	11 (39)
OS (mediana)	31.2 [6.7-296.20]
DFS (mediana)	22.3 [5.1-162.30]

Come mostrato in **Figura 9** le mansioni lavorative più rappresentative erano relative alla lavorazione del legno (falegname) e del cuoio (calzolai).

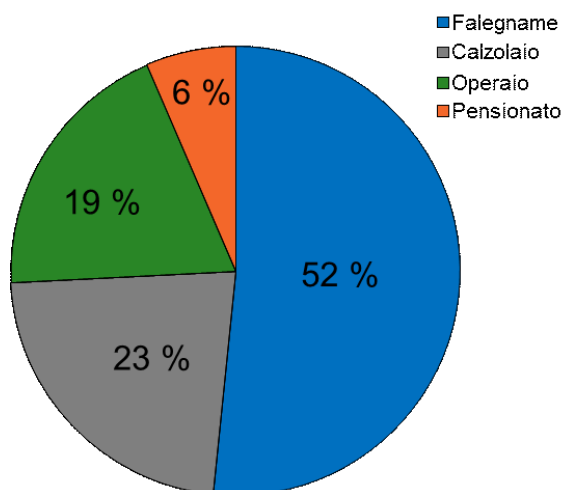


Fig.9 Distribuzione delle mansioni lavorative nei pazienti affetti da ITAC

Dall'analisi di espressione dei miRNA identificati, si è osservato che, come precedentemente evidenziato dall'analisi del miRNoma, il miR-34b, il miR-205, e il miR-449a, erano significativamente sotto-espressi nel tessuto patologico, mentre il miR-192 si trovava sovra-espresso (**Figura 10**).

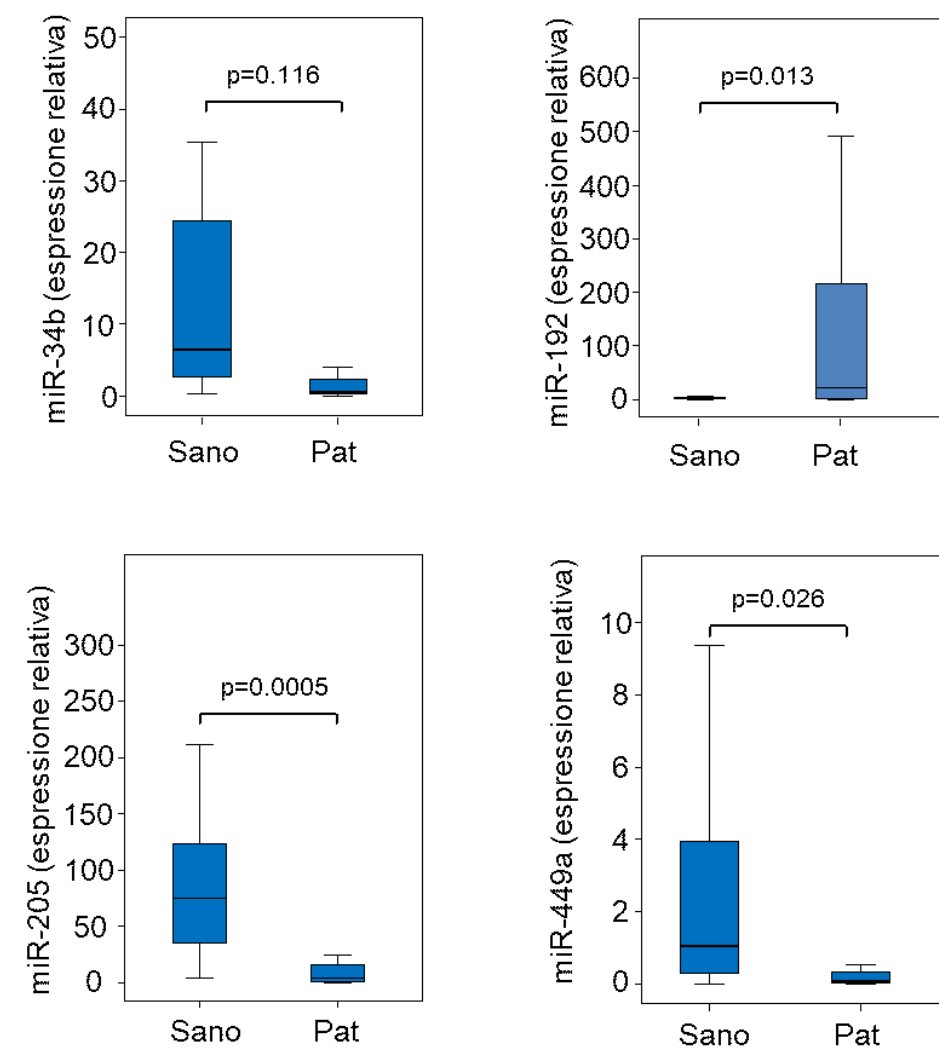
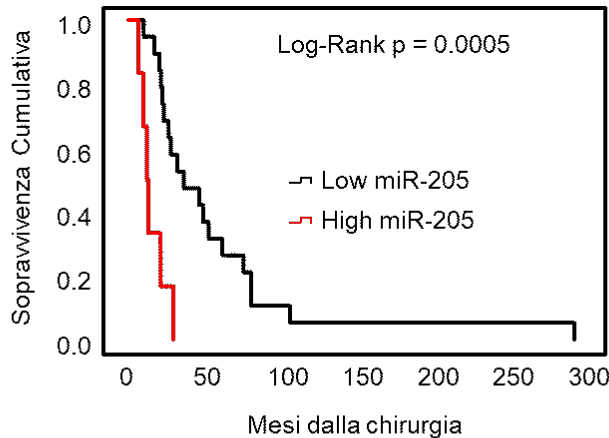


Fig.10 Distribuzione dell'espressione del miR-34b, miR-192, miR-205, e miR-449a nel tessuto sano e tessuto patologico (Pat). Le linee nelle caselle rappresentano i valori mediani, le linee verticali rappresentano i valori minimo e massimo. Le differenze tra sano e patologico sono state considerate statisticamente significative con valori di $p < 0.05$.

Fase III: Valore clinico dei miRNAs

Gli adenocarcinomi di tipo intestinale naso-sinusale (ITACs) sono neoplasie molto aggressive, e nonostante la gestione multidisciplinare con trattamenti multimodali (chirurgia, radioterapia) sono caratterizzati da una prognosi generalmente molto sfavorevole (Perri et al., 2019). In questo

contesto, l'identificazione di nuovi biomarcatori diagnostici e prognostici risulta fondamentale per migliorare l'autocome di questi pazienti. Allo scopo di valutarne il valore clinico l'espressione dei 4-miRNAs dei pazienti ITAC è stata correlata con lo stadio clinico e lo stadio clinico ed il grading istologico del tumore. Inoltre, la sopravvivenza globale (overall survival, OS) e il tempo libero da malattia (disease-free survival, DFS) sono state analizzate mediante la curva Kaplan-Meier e i gruppi dei miRNA (sotto e sopra la mediana) sono stati confrontati usando il test log-rank. Le variabili statisticamente significative sono state inserite in un modello di regressione multivariata di Cox. Dall'analisi univariata, il miR-205 aveva un valore prognostico statisticamente significativo (**Figura 11**). In particolare, i pazienti con miR-205 basso (down-regulation) presentavano una prognosi migliore rispetto ai pazienti con alti (up-regulation) livelli di miR-205 (OS, mediana 36.7 [10-63.4] verso 12.2 [8.2-16.2], $p=0.0005$).



miR-205	Mediana per tempo di sopravvivenza			
Gruppi	Mediana	Errore Stand.	Minimo	Massimo
Low miR-205	36.7	13.6	10.0	63.4
High miR-205	12.2	2.0	8.2	16.2
Totale	28.2	5.4	17.6	38.8

Fig. 11 Curve di sopravvivenza globale di Kaplan-Meier per ITAC suddivise per espressione miR-205. L'espressione del miR-205 è stata associata alla sopravvivenza globale (OS) dopo terapia

chirurgica. I confronti tra i gruppi sono stati eseguiti utilizzando il test log-rank e i valori $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

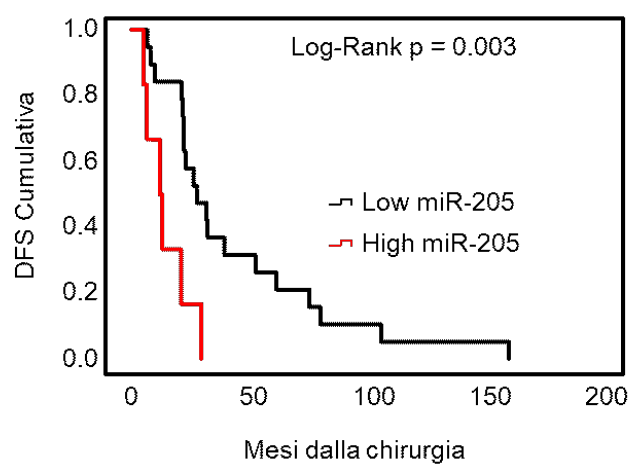
L'analisi multivariata conferma il valore clinico del miR-205 come un biomarcatore di prognosi indipendente insieme al grading del tumore (**Tabella XII**).

Tabella XIII. Analisi Multivariata Regressione di Cox associata con la sopravvivenza

miR-205	RC (B)	SE	Wald	p-value	HR value	95% CI (OR)
Passo-1						
Età	-0.019	0.024	0.646	0.422	0.981	0.937-1.028
Sesso	2.667	1.538	3.006	0.083	14.4	0.706-293.6
Fumo	-1.268	0.824	2.367	0.124	0.281	0.080-1.508
Grading	-2.690	1.222	4.843	0.028	0.068	0.006-0.745
Stadio	-1.687	1.155	2.132	0.144	0.185	0.019-1.782
miR-205	4.666	1.240	14.170	0.0005	106.275	9.361-1206.48
Passo-6						
Grading	-2.520	1.125	5.018	0.025	0.080	0.009-0.730
miR-205	2.830	0.750	14.252	0.0005	16.946	3.899-73.649

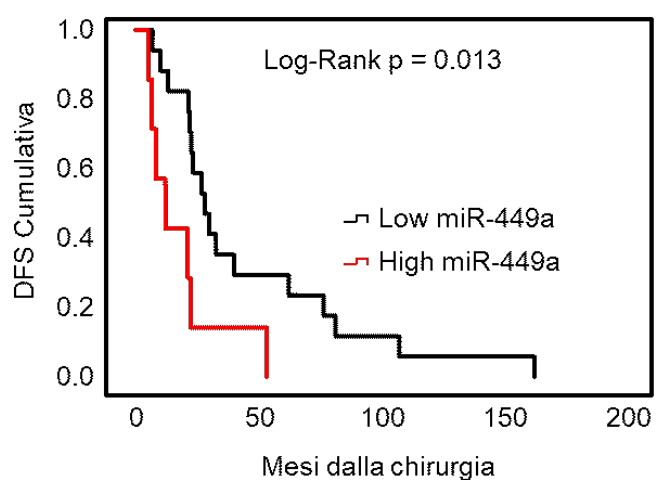
Modello di Regressione Wald-backward aggiustato per età, sesso, fumo, grading, stadio

Inoltre, sia l'espressione del miR-205 che del miR-449a erano significativamente correlate al tempo libero da malattia (Disease Free Survival). In particolare, elevati livelli dei due miRNAs (up-regulation) erano associati ad un più alto rischio di recidiva e quindi ad una prognosi peggiore (**Figura 12 e Figura 13**).



miR-205	Mediana per tempo libero da malattia (DFS)			
	Mediana	Errore Stand.	Minimo	Massimo
Low miR-205	28.2	6.5	15.5	41.0
High miR-205	12.2	4.0	4.3	20.1
Totale	23.4	3.6	16.3	30.5

Fig. 12 Curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier in relazione all'espressione del miR-205. L'espressione del miR-205 è stata associata al periodo libero da malattia (DFS). I confronti tra i gruppi sono stati effettuati utilizzando il test log-rank e i valori $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi



miR-449a	Mediana per tempo libero da malattia (DFS)			
	Mediana	Errore Stand.	Minimo	Massimo
Gruppi				
Low miR-205	28.2	4.4	19.5	37.0
High miR-205	12.2	5.2	2.0	22.5
Totale	22.6	2.9	17.0	28.3

Fig. 13 Curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier in relazione all' espressione del miR-449a. L'espressione del miR-449a è stata associata al periodo libero da malattia (DFS). I confronti tra i gruppi sono stati effettuati utilizzando il test log-rank e i valori $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

L'analisi multivariata conferma il valore predittivo indipendente del miR-205 e miR-449a. Bassi livelli (down-regulation) di miR-205 o miR-449a si correla ad un rischio di recidiva, rispettivamente di circa 11 e 3 volte (**Tabella XIV**).

I microRNAs miR-34b, miR-192 non evidenziavano correlazioni significative con i parametri clinici valutati.

Tabella XIV. Analisi Multivariata Regressione di Cox associata con periodo libero da malattia (disease free survival, DFS).

miR-205	RC (B)	SE	Wald	p-value	HR value	95% CI (OR)
Passo-1						
Età	-.005	0.021	0.068	0.794	0.995	0.955-1.036
Sesso	0.396	1.579	0.063	0.802	1.486	0.067-32.833
Fumo	-1.058	0.767	1.904	0.168	0.347	0.077-1.560
Grading	-3.206	1.249	6.588	0.010	0.041	0.004-0.469
Stadio	-1.589	1.320	1.448	0.229	0.204	0.015-2.716
miR-205	-3.076	1.203	6.536	0.011	0.046	0.004-0.488
Passo-5						
Grading	-2.521	1.128	4.997	0.025	0.080	0.009-0.733
miR-205	-2.470	0.733	11.368	0.001	0.085	0.020-0.356

miR-449a	RC (B)	SE	Wald	p-value	HR value	95% CI (OR)
Passo-1						
Età	-.003	0.022	0.020	0.888	0.997	0.955-1.041
Sesso	-	-	-	-	-	-
Fumo	-0.934	0.779	1.436	0.231	0.393	0.085-1.810
Grading	-1.645	1.437	1.311	0.252	0.193	0.012-3.226
Stadio	-0.413	1.054	0.154	0.695	0.662	0.084-5.217
miR-449a	-1.177	0.873	1.817	0.178	0.308	0.056-1.706
Passo-6						
miR-449a	-1.195	0.497	5.787	0.016	0.303	0.114-0.801

Modello di Regressione Wald-backward aggiustato per età, sesso fumo, grading, stadio.

DISCUSSIONE

La sopravvivenza dei pazienti con adenocarcinoma dei seni paranasali e delle cavità nasali, pur con il miglioramento delle tecniche chirurgiche (approcci combinati endoscopici), delle terapie complementari (radioterapia e/o chemioterapia) e di protocolli integrati oggi a disposizione è rimasta sostanzialmente invariata negli ultimi 10 anni. E' difficile spiegare come alcune neoplasie a parità di sede e di stadio presentino un'evoluzione clinica differente. Ancora oggi non esistono, quindi, elementi di certezza correlabili alla prognosi di ogni singola neoplasia.

Alla luce di queste considerazioni si sono sviluppati studi di biologia molecolare con lo scopo di rilevare sottogruppi di neoplasie con particolari caratteristiche evolutive e di apportare maggiori conoscenze sulle modalità di trasformazione delle cellule in senso neoplastico per permettere di attuare strategie terapeutiche preventive e mirate per ogni singola neoplasia in base ad una esatta definizione delle sue caratteristiche biologiche ^(114, 119,120).

Sebbene infatti gli eventi molecolari coinvolti nella patogenesi di ITAC ⁽¹⁵⁹⁻¹⁷⁰⁾ siano ancora sconosciuti, crescenti informazioni sui meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi dei carcinomi a cellule squamose della testa e del collo (HNSCC) ⁽¹⁷¹⁻¹⁸¹⁾ evidenziano il ruolo dell'epigenetica in questo processo. ⁽¹⁸²⁻¹⁸⁴⁾.

MicroRNA (miRNA), una classe di piccole molecole di RNA non codificanti proteine che controllano l'espressione di geni bersaglio, sono ora riconosciuti come componenti cruciali dell'epigenoma, orchestrando eventi che vanno dall'organogenesi all'immunità, e sono noti per essere critici nello sviluppo di molte malattie, incluso il cancro. ⁽¹⁸⁵⁻¹⁸⁷⁾

Regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale legandosi a siti parzialmente complementari nelle zone 3'-UTR (regioni non tradotte) dei bersagli dei loro RNA messaggeri. I microRNA funzionano come repressori di espressione genica a livello post-trascrizionale, influenzando la traduzione o causando il degrado degli obiettivi di mRNA. ^(188, 189).

Apparentemente, i miRNA possono agire come soppressori tumorali o oncogeni regolando rispettivamente gli oncogeni o i geni soppressori del tumore. ⁽¹⁹⁰⁾ È interessante notare che il profilo di espressione globale di miRNA nei tessuti normali è distinto da quello nei tessuti tumorali. ⁽¹⁹¹⁾ La

regolazione del MiRNA è compromessa nel cancro e una serie di studi ha suggerito che tale disregolazione può essere associata alla prognosi. ⁽¹⁹²⁻¹⁹⁵⁾ Sebbene alterazioni nell'espressione di miRNAs nei tumori maligni della testa e del collo (HNSCC) siano state recentemente definite in diversi studi⁽¹⁹⁶⁻¹⁹⁹⁾ non si sa molto su come queste differenze siano legate alle caratteristiche cliniche e ai fattori di rischio di malattia.

Per ottenere ulteriori informazioni sul fenotipo e sui possibili meccanismi molecolari dell'ITAC etmoidale, abbiamo utilizzato la tecnologia NGS per la valutazione globale di tutti i miRNA conosciuti e non (miRNoma) in campioni tumorali di pazienti affetti da ITAC. Dall'analisi del miRNoma è stato identificato un profilo di miRNAs costituzionalmente deregolati nel tumore 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, sono stati selezionati 4-miRNAs (miR-34b, miR-192, miR-205, miR-449a), i quali sono stati successivamente validati in una popolazione di pazienti ITAC più ampia. Una sotto-espressione del livello tumorale è stata confermata per il miR-34b, miR-205 e miR-449a mentre il miR-192 si trovava sovra-espresso nel tumore rispetto all'adiacente tessuto sano.

Allo scopo di valutarne il valore clinico, l'espressione dei 4-miRNAs dei pazienti ITAC è stata correlata con lo stadio clinico del tumore. Inoltre, la sopravvivenza globale (overall survival, OS) e il tempo libero da malattia (disease-free survival, DFS) sono state analizzate mediante la curva Kaplan-Meier e i gruppi dei miRNA (sotto e sopra la mediana) sono stati confrontati usando il test log-rank.

L'analisi di regressione multivariata di Cox è stata utilizzata per valutare i fattori di predizione indipendenti di sopravvivenza. 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).

Sia l'espressione del miR-205 che del miR-449a risulta significativamente correlate al tempo libero da malattia (Disease Free Survival). In particolare, elevati livelli dei due miRNAs (up-regulation) sono associati ad un più alto rischio di recidiva e quindi ad una prognosi peggiore. L'analisi multivariata conferma il valore predittivo indipendente del miR-205 e miR-449a. Bassi livelli (down-regulation) di miR-205 o miR-449a si correlano ad un rischio di recidiva, rispettivamente di circa 11 e 3 volte.

Dall'analisi della letteratura si rileva che il miR-205 è stato trovato deregolato in numerosi tumori; in particolare risulta sovra-espresso nel tumore della vescica, della prostata, pancreas e nel tumore

al polmone ⁽²⁰⁰⁻²⁰³⁾. Mentre bassi livelli di miR-205 sono stati osservati nel tumore alla mammella, prostata e nel melanoma maligno ⁽²⁰⁴⁻²⁰⁶⁾.

Diverse evidenze supportano il doppio ruolo del miR-205 che agisce sia come onco-soppressore attraverso l'inibizione della crescita e invasione tumorale, sia come onco-promotore coinvolto nell'iniziazione tumorale e nella resistenza al trattamento radio-chemioterapico. (Si rimanda alla trattazione su miR-205 nel capitolo dedicato nella parte generale).

Nel nostro studio sperimentale le curve di Kaplan-Meier mostrano che il miR-205 e il miR-449a sono correlati alla sopravvivenza libera da malattia (DFS) dei pazienti ITAC; i pazienti con un'espressione più elevata (up-regulation) sia di miR-205 sia di miR-449a presentano un periodo libero da malattia più breve (rischio di recidiva a breve termine) ($p=0.003$) e quindi una prognosi peggiore.

Nella valutazione prognostica, a differenza della sopravvivenza globale (overall survival) come 'endpoint', la valutazione della Disease Free Survival (DFS) fornisce misure più rapide riguardo all'efficacia del trattamento, la DFS è meno influenzata dai trattamenti successivi, cure palliative e comorbidità ⁽²⁰⁷⁾.

Dal punto di vista fisiologico, entrambi i miRNAs sono coinvolti nell'organizzazione dei tessuti epiteliali; mentre il miR-205 regola la struttura dell'epitelio, il miR-449a è essenziale nello sviluppo degli epitelii ciliati ⁽²⁰⁸⁾. In particolare, il 'cluster' miR-449 ha delle similitudini in sequenza con la famiglia del miR-34, e sono classificati come un'unica famiglia di miRNA coinvolta nella differenziazione degli epitelii ciliati delle vie aeree superiori che sono la prima linea di difesa nel tratto respiratorio contro gli agenti tossici ⁽²⁰⁹⁾. La famiglia miR-34/miR-449 controlla la formazione della struttura apicale dell'actina, un prerequisito importante per l'ancoraggio ed elongazione delle ciglia ⁽²¹⁰⁾. Nell'epitelio della mucosa nasale i miR-34 e miR-449 si accumulano nelle cellule multiciliate ⁽²⁰⁹⁾, mentre nelle forme tumorali entrambi i miRNA sono stati trovati sotto-espressi. Infatti, 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. In accordo con quanto da noi riportato, il miR-449a è stato trovato sotto-espresso in numerosi altri tumori incluso il tumore al polmone, colon-retto, gastrico, cervice, prostata ⁽²¹⁰⁻²¹⁴⁾. 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 ⁽²¹⁵⁾. A livello tumorale il miR-449a è coinvolto nell'inibizione della crescita tumorale, invasione, metastasi, ed è capace di indurre apoptosi

mediante attivazione TGF- β (Tumour growth transforming factor- β), NOTCH, NF κ B, retinoblastoma-E2F, MAPK, WNT- β -catenina ⁽²¹⁶⁾. Inoltre, è stato osservato che il miR-449 aumentava la sensibilità delle cellule tumorali alle radiazioni ionizzanti sia in vitro (coltura cellulare) che in vivo (modello di xenotrapianto animale) ⁽²¹⁷⁾.

Nonostante studi precedenti abbiano descritto miR-449a come un onco-soppressore, nel nostro studio abbiamo osservato che alti livelli di miR-449a nel tessuto tumorale ITAC erano associati ad una prognosi peggiore. Questa contraddizione è stata osservata anche per il miR-205; se da un lato, i livelli del miR-449a erano bassi nel tessuto tumorale rispetto alla parte non-neoplastica, dall'altro lato l'avere una bassa espressione di tale miRNA a livello tumorale comportava una prognosi migliore. Queste osservazioni suggeriscono che l'effetto onco-soppressore o onco-promotore dei miRNAs dipende da diversi fattori incluso il tipo di tumore e la caratteristica biologica.

CONCLUSIONI

Il presente studio fornisce la prima evidenza che una iperespressione di miR-205 e miR-449a negli adenocarcinomi di tipo intestinale etmoidale (ITAC) è associata ad un maggior rischio di recidiva (ridotto tempo libero da malattia -Desease Free Survival- DFS) e ad una ridotta sopravvivenza complessiva (Overall Survival - OS), suggerendo che la mutazione di questi microRNAs in combinazione con ulteriori eventi genetici, potrebbe svolgere un ruolo significativo nella patogenesi dell'ITAC.

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

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Massimo Re per avermi proposto questo lavoro di tesi, che ha coniugato due mie grandi passioni, il mondo molecolare dei miRNAs e la clinica ORL. Lo ringrazio inoltre per la disponibilità e l'attenzione alla correzione della tesi.

Ringrazio allo stesso modo il Dott. Marco Tomasetti della Medicina del lavoro, diretta dalla prof.ssa Lory Santarelli, per l'aiuto nella parte più prettamente sperimentale e nell'elaborazione statistica dei dati.

Ringrazio inoltre il Prof. Antonio Procopio, per avermi appassionato agli aspetti bio-molecolari applicati alle problematiche cliniche e per avermi sostenuto nel mio percorso formativo.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Batsakis JG, Rice DH, Solomon AR. The pathology of head and neck tumors: squamous and mucous-gland carcinomas of the nasal cavity, paranasal sinuses, and larynx, part 6. *Head Neck Surg* 1980;2: 497-508.
- 2) Sisson GA, Beck SP. Cancer of the nasal and paranasal sinuses. In: *Cancer of the Head and Neck*, Suen JY, Myers EN, eds., Churchill Livingstone: New York 1981, pp. 242-279
- 3) Lewis JS, Castro EB. Cancer of the nasal cavity and paranasal sinuses. *J Laryngol Otol* 1972;86: 255-262.
- 4) Robin PE, Powell DJ, Stansbie JM(1979). Carcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses: incidence and presentation of different histological types. *Clin Otolaryngol* 4: 431-456.
- 5) Stellman SD, Demers PA, Colin D, Boffetta P. Cancer mortality and wood dust exposure among participants in the American Cancer Society Cancer Prevention Study-II (CPS-II). *Am J Ind Med.* 1998 Sep;34(3):229-37.
- 6) International Agency for Research on Cancer : Overall evaluations of Carcinogenicity: an Updating. IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic risks to humans, Suppl. 7, 1987.
- 7) International Agency for Research on Cancer: Lists of IARC Evaluations. IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic risks to humans, 1994.
- 8) Alderson MR, Rattan NS. Mortality of workers on an isopropyl alcohol plant and two MEK dewaxing plants. *Br J Ind Med.* 1980 Feb;37(1):85-9.
- 9) Battista G, Cavallucci F, Comba P, Quercia A, Vindigni C, Sartorelli E. A case-referent study on nasal cancer and exposure to wood dust in the province of Siena, Italy. *Scand J Work Environ Health.* 1983 Feb;9(1):25-9.
- 10) Nylander LA, Dement JM. Carcinogenic effects of wood dust: review and discussion. *Am J Ind Med.* 1993 Nov;24(5):619-47.
- 11) Acheson ED. Nasal cancer in the furniture and boot and shoe manufacturing industries. *Prev Med.* 1976 Jun;5(2):295-315.
- 12) Acheson ED, Cowdell RH, Jolles B. Nasal cancer in the Northamptonshire boot and shoe industry. *Br Med J.* 1970 Feb 14;1(5693):385-93.
- 13) Battista G, Comba P, Orsi D, Norpoth K, Maier A. Nasal cancer in leather workers: an occupational disease. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1995;121(1):1-6.
- 14) Acheson ED, Cowdell RH, Rang E. Adenocarcinoma of the nasal cavity and sinuses in England and Wales. *Br J Ind Med.* 1972;29(1):21-30.
- 15) Acheson ED, Cowdell RH, Rang EH. Nasal cancer in England and Wales: an occupational survey. *Br J Ind Med.* 1981 Aug;38(3):218-24.
- 16) Engzell U et al. : Nasal cancer

- 17) Tola S, Hernberg S, Collan Y, Linderborg H, Korkala ML. A case-control study of the etiology of nasal cancer in Finland. *Int Arch Occup Environ Health*. 1980;46(1):79-85.
- 18) Battista G, Carboncini F, De Capua B, Vinigni C, Giglioli S, Orsi D: Studio caso-controllo sui tumori maligni epiteliali delle fosse nasali e dei seni paranasali in provincia di Siena nel periodo 1982-88:progetto "oncologia" CNR, pp 253-278. In: Atti del Seminario Internazionale "Aggiornamenti in tema di neoplasie di origine professionale", Siena 19-21 novembre 1991. Ed. Un. Litografia Felici, Pisa, 1992.
- 19) Houten L, Bross ID, Viadana E, Sonnesso G. Occupational cancer in men exposed to metals. *Adv Exp Med Biol*. 1977;91:93-102.
- 20) Brinton LA, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. Nasal cancer in the textile and clothing industries. *Br J Ind Med*. 1985 Jul;42(7):469-74.
- 21) Battista G, Orsi D, Giglioli S et al.; Il cancro delle fosse nasali e dei seni paranasali tra i lavoratori dell'industria tessile e dell'abbigliamento, 229-234. In : Atti del Convegno Nazionale "Salute nell'attività produttiva tessile" Ed.S.G. Editoriale, Padova, 1992.
- 22) Kaldor J, Peto J, Easton D, Doll R, Hermon C, Morgan L. Models for respiratory cancer in nickel refinery workers. *J Natl Cancer Inst*. 1986 Oct;77(4):841-8.
- 23) Magnus K, Andersen A, Høgetveit AC. Cancer of respiratory organs among workers at a nickel refinery in Norway. *Int J Cancer*. 1982 Dec 15;30(6):681-5.
- 24) Andersen A, Berge SR, Engeland A, Norseth T. Exposure to nickel compounds and smoking in relation to incidence of lung and nasal cancer among nickel refinery workers. *Occup Environ Med*. 1996 Oct;53(10):708-13.
- 25) Sunderman FW Jr. Nickel carcinogenesis. *Dis Chest*. 1968 Dec;54(6):527-34.
- 26) Kaldor J, Peto J, Easton D, Doll R, Hermon C, Morgan L. Models for respiratory cancer in nickel refinery workers. *J Natl Cancer Inst*. 1986 Oct;77(4):841-8.
- 27) Enterline PE. Respiratory cancer among chromate workers. *J Occup Med*. 1974 Aug;16(8):523-6.
- 28) Newman D.: A case of adenocarcinoma of the left inferior turbinated body, and perforation of the nasal septum, in the person of a worker in chrome pigments. *Glasgow Med. J.*,33, 469-470,1890.
- 29) Alderson MR, Rattan NS, Bidstrup L. Health of workmen in the chromate-producing industry in Britain. *Br J Ind Med*. 1981 May;38(2):117-24.
- 30) Langård S. One hundred years of chromium and cancer: a review of epidemiological evidence and selected case reports. *Am J Ind Med*. 1990;17(2):189-215.
- 31) Comba P, Barbieri PG, Battista G, Belli S, Ponterio F, Zanetti D, Axelson O. Cancer of the nose and paranasal sinuses in the metal industry: a case-control study. *Br J Ind Med*. 1992 Mar;49(3):193-6.
- 32) Hueper W.C.: Occupational and environmental cancers of the the respiratory system, 30-38. In: Heuper W.C.: Recent Reesults in Cancer Research. Ed. Springer-Verlag, Berlin, 1966.

- 33) Wada S, Miyanishi M, Nishimoto Y, Kambe S, Miller RW. Mustard gas as a cause of respiratory neoplasia in man. *Lancet*. 1968 Jun 1;1(7553):1161-3.
- 34) Blair A, Stewart P, O'Berg M, Gaffey W, Walrath J, Ward J, Bales R, Kaplan S, Cubit D. Mortality among industrial workers exposed to formaldehyde. *J Natl Cancer Inst*. 1986 Jun;76(6):1071-84.
- 35) Luce D, Gérin M, Leclerc A, Morcet JF, Brugère J, Goldberg M. Sinonasal cancer and occupational exposure to formaldehyde and other substances. *Int J Cancer*. 1993 Jan 21;53(2):224-31.
- 36) Hardell L, Johansson B, Axelson O. Epidemiological study of nasal and nasopharyngeal cancer and their relation to phenoxy acid or chlorophenol exposure. *Am J Ind Med*. 1982;3(3):247-57.
- 37) Roush GC, Meigs JW, Kelly JA, Flannery JT, Burdo H. Sinonasal cancer and occupation: a case-control study. *Am J Epidemiol*. 1980 Feb;111(2):183-93.
- 38) Neri S, Iaia TE, Battista G, Roselli MG. Sentinel events in occupational medicine: the example of Local Health Unit No. 1 of the Tuscany region. *Epidemiol Prev*. 1989 Jun;11(39):29-34.
- 39) Mirabelli MC, Hoppin JA, Herrick R, Tolbert PEF, Gnepp DR, Brann EA. Occupational exposure to chlorophenol and the risk of nasal and nasopharyngeal cancers among U.S. men aged 30 to 60.
- 40) Hayes RB, Gerin M, Raatgever JW, de Bruyn A. Wood-related occupations, wood dust exposure, and sinonasal cancer. *Am J Epidemiol*. 1986 Oct;124(4):569-77.
- 41) Comba P.: Epidemiologic Studies of nasal Cancer and Occupational exposures. Linköping University Medical Dissertations, No. 352. Linköping, 1992.
- 42) Fukuda K, Shibata A. A case-control study of past history of nasal diseases and maxillary sinus cancer in Hokkaido, Japan. *Cancer Res*. 1988 Mar 15;48(6):1651-2. Fukuda K, Shibata A 1988
- 43) Strader CH, Vaughan TL, Stergachis A. Use of nasal preparations and the incidence of sinonasal cancer. *J Epidemiol Community Health*. 1988 Sep;42(3):243-8.
- 44) Ding GQ, Zheng CQ, Bagga SS. Up-regulation of the mucosal epidermal growth factor receptor gene in chronic rhinosinusitis and nasal polyposis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007 Nov;133(11):1097-103.
- 45) Fukuda K, Shibata A, Harada K. Squamous cell cancer of the maxillary sinus in Hokkaido, Japan: a case-control study. *Br J Ind Med*. 1987 Apr;44(4):263-6.
- 46) Hiyama T, Oshima A, et al. : Epidemiology of Maxillary Sinus Cancer. *Jpn. J. Public Health*, 27, 177-186, 1980.
- 47) Shimizu H, Hozawa J, Saito H, Murai K, Hirata H, Takasaka T, Togawa K, Konno A, Kimura Y, Kikuchi A, et al. Chronic sinusitis and woodworking as risk factors for cancer of the maxillary sinus in northeast Japan. *Laryngoscope*. 1989 Jan;99(1):58-61.
- 48) Bouaziz A, Chabardes E, Laccourreye O, Menard M, Brasnu D, Laccourreye H. [Extension to the infratemporal fossa of malignant tumors of the face]. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac*. 1991;108(2):113-8.

- 49) Cantù G, Solero CL, Mariani L, Mattavelli F, Pizzi N, Licitra L. A new classification for malignant tumors involving the anterior skull base. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999 Nov;125(11):1252-7.
- 50) Facchetti F, Antonelli AR, Nicolai P. Correlazioni clinico-patologiche. In: Rel. Uff: I tumori maligni dei seni paranasali. LXXXII Congr. Naz. Viterbo Maggio 1995 : 106-222.
- 51) Kondo M, Ogawa K, Inuyama Y, Yamashita S, Tominaga S, Shigematsu N, Nishiguchi I, Hashimoto S. Prognostic factors influencing relapse of squamous cell carcinoma of the maxillary sinus. *Cancer.* 1985 Jan 1;55(1):190-6.
- 52) Schwaab G, Brugere J, Lefbvre JM. Tumours of the nasal cavities and paranasal sinuses. An analysis of 746 patients treated over a 10 year period, 60. Abstracts Book. Third International Conference on Head and Neck Cancer, San Francisco 1992.
- 53) Shah JP, Kraus DH, Arbit E, Galicich JH, Strong EW. Craniofacial resection for tumors involving the anterior skull base. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1992 Apr;106(4):387-93.
- 54) Hopkin N.; McNicoll W.; Dalley V.M.; Shaw H.J.: Cancer of paranasal sinuses and nasal cavities. Part I. Clinical features. *J. Laryngol. Otol.*,98, 585-595, 1984.
- 55) Ketcham A.S.; van Buren J.M.: Tumors of the paranasal sinuses: a therapeutic challenge. *Am. J. Surg.*, 150, 406-411, 1985.
- 56) Weber A.L.; Stanton A.C.: Malignant tumors of the paranasal sinuses: radiologic, clinical, and histopatologic evaluation of 200 cases. *Head Neck*, 6, 761-776, 1984.
- 57) Hermanek P, Scheibe O, Spiessl B, Wagner G. Rontgenblatter. TNM classification of malignant tumors: the new 1987 edition. 1987 Jun;40(6):200.
- 58) Schwab W, Clasen B, Steinhoff HJ. Report of experiences (1974-1986) in classification and site distribution of malignant tumors of the organs of the inner nose and paranasal sinuses. A retrospective review of over 1,296 cases. *HNO.* 1988 Apr;36(4):154-7.
- 59) Calearo C, Pastore A, Merlo R. Cancer of the facial mass. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 1987;7 Suppl 14:1-27.
- 60) Patel SG, Shah JP. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *CA Cancer J Clin.* 2005 Jul-Aug;55(4):242-58; quiz 261-2, 264.
- 61) Stammberger H, Anderhuber W, Walch C, Papaefthymiou G. Possibilities and limitations of endoscopic management of nasal and paranasal sinus malignancies. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 1999;53(3): 199-205.
- 62) Nicolai P, Castelnovo P, Lombardi D, Battaglia P, Bignami M, Pianta L, Tomenzoli D. Role of endoscopic surgery in the management of selected malignant epithelial neoplasms of the naso-ethmoidal complex. *Head Neck.* 2007 Dec;29(12):1075-82.
- 63) Cantù G, Solero CL, Mariani L, Salvatori P, Mattavelli F, Pizzi N, Riggio E. Anterior craniofacial resection for malignant ethmoid tumors--a series of 91 patients. *Head Neck.* 1999 May;21(3):185-91.
- 64) Myers LL, Oxford LE. Differential diagnosis and treatment options in paranasal sinus cancers. *Surg Oncol Clin N Am.* 2004 Jan;13(1):167-86.

- 65) Hoppe BS, Stegman LD, Zelefsky MJ, Rosenzweig KE, Wolden SL, Patel SG, Shah JP, Kraus DH, Lee NY. Treatment of nasal cavity and paranasal sinus cancer with modern radiotherapy techniques in the postoperative setting--the MSKCC experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007 Mar 1;67(3):691-702. Epub 2006 Dec 8.
- 66) Dirix P, Nuyts S, Geussens Y, Jorissen M, Vander Poorten V, Fossion E, Hermans R, Van den Bogaert W. Malignancies of the nasal cavity and paranasal sinuses: long-term outcome with conventional or three-dimensional conformal radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007 Nov 15;69(4):1042-50. Epub 2007 Jun 14.
- 67) Gabriele AM, Airoidi M, Garzaro M, Zeverino M, Amerio S, Condello C, Trotti AB. Stage III-IV sinonasal and nasal cavity carcinoma treated with three-dimensional conformal radiotherapy. *Tumori*. 2008 May-Jun;94(3):320-6.
- 68) Pommier P, Ginestet C, Sunyach M, Zrounba P, Poupart M, Céruse P, Ciupea C, Carrie C, Montbarbon X. Conformal radiotherapy for paranasal sinus and nasal cavity tumors: three-dimensional treatment planning and preliminary results in 40 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000 Sep 1;48(2):485-93.
- 69) Samant S, Robbins KT, Vang M, Wan J, Robertson J. Intra-arterial cisplatin and concomitant radiation therapy followed by surgery for advanced paranasal sinus cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004 Aug;130(8):948-55.
- 70) Madison Michael L 2nd, Sorenson JM, Samant S, Robertson JH. The treatment of advanced sinonasal malignancies with pre-operative intra-arterial cisplatin and concurrent radiation. *J Neurooncol*. 2005 Mar;72(1):67-75.
- 71) Knecht PP, Ah-See KW, vd Velden LA, Kerrebijn. Adenocarcinoma of the ethmoidal sinus complex: surgical debulking and topical fluorouracil may be the optimal treatment. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001 Feb;127(2): 141-6
- 72) Kondo M, Ogawa K, Inuyama Y, Yamashita S, Tominaga S, Shigematsu N, Nishiguchi I, Hashimoto S. Prognostic factors influencing relapse of squamous cell carcinoma of the maxillary sinus. *Cancer*. 1985 Jan 1;55(1):190-6.
- 73) Dreyfuss AI, Clark JR. Analysis of prognostic factors in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1991 Aug;5(4):701-12.
- 74) Reid BC, Alberg AJ, Klassen AC, Samet JM, Rozier RG, Garcia I, Winn DM. Comorbidity and survival of elderly head and neck carcinoma patients. *Cancer*. 2001 Oct 15;92(8):2109-16.
- 75) Mac Comb WS, Fletcher GH. *Cancer of head and neck*. Baltimore: Williams and Wilkins 1967.
- 76) Chiesa F, Squadrelli Saraceno M, eds. *Fattori prognostici in oncologia cervico-facciale*. Pisa: Pacini Ed. 1998
- 77) Cortesina G. *Oncogeni e carcinogenesi dei carcinomi cervico-cefalici*. Torino: Edizione Minerva Medica 2002.
- 78) Barra S, Barzan L, Maione A, Cadelano A, Pin M, Franceschi S, Comoretto R. Blood transfusion and other prognostic variables in the survival of patients with cancer of the head and neck. *Laryngoscope*. 1994 Jan;104(1 Pt 1):95-8.

- 79) Cantù G, Pizzi N, Mattavelli F, Salvatori P, Nardo L. Carcinomi naso-sinusali. In: Chiesa F, Squadrelli Saraceno M, eds. Fattori prognostici in oncologia cervico-facciale. Pisa: Pacini Ed. 1998;17-27.
- 80) Cantù G, Cardani G, Bimbi G. Trattamento integrato delle neoplasie dei seni paranasali. In: Banfi A, Lattuada A, Santoro A, Zucali R, eds. Radioterapia e trattamenti integrati. Milano: Casa Editrice Ambrosiana 1988: 141-153.
- 81) Cantù G, Mattavelli F, Salvatori P, Pizzi N, Guzzo M. Combined transfacial and infratemporal approaches for T3-T4 malignant maxillary tumors. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 1995 Oct;15(5):345-54.
- 82) Paulino AC, Fisher SG, Marks JE. Is prophylactic neck irradiation indicated in patients with squamous cell carcinoma of the maxillary sinus? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997 Sep 1;39(2):283-9.
- 83) Shingaki S, Suzuki I, Kobayashi T, Nakajima T. Predicting factors for distant metastases in head and neck carcinomas: an analysis of 103 patients with locoregional control. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996 Jul;54(7):853-7.
- 84) Badib AO, Kurohara SS, Webster JH, Shedd DP. Treatment of cancer of the paranasal sinuses. *Cancer.* 1969 Mar;23(3):533-7.
- 85) Kademani D, Bell RB, Bagheri S, Holmgren E, Dierks E, Potter B, Homer L. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Nov;63(11):1599-605.
- 86) Janot F, Klijanienko J, Russo A, Mamet JP, de Braud F, El-Naggar AK, Pignon JP, Lubinski B, Cvitkovic E. Prognostic value of clinicopathological parameters in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective analysis. *Br J Cancer.* 1996 Feb;73(4):531-8.
- 87) Machtay M, Perch S, Markiewicz D, Thaler E, Chalian A, Goldberg A, Kligerman M, Weinstein G. Combined surgery and postoperative radiotherapy for carcinoma of the base of radiotherapy for carcinoma of the base of tongue: analysis of treatment outcome and prognostic value of margin status. *Head Neck.* 1997 Sep;19(6):494-9.
- 88) Alvi A, Johnson JT. Development of distant metastasis after treatment of advanced-stage head and neck cancer. *Head Neck.* 1997 Sep;19(6):500-5.
- 89) Netterville JL, Sinard RJ, Bryant GL Jr, Burkey BB. Delayed regional metastasis from midfacial squamous carcinomas. *Head Neck.* 1998 Jul;20(4):328-33.
- 90) De Stefani A, Magnano M, Bussi M, Cravero L, Lerda W, Usai A, Cavalot A, Ragona R, Gabriele P, Valente G, Cortesina G. Identification of clinical, biological and prognostic factors in recurring squamous cell carcinoma of the head and neck. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 1997 Jun;17(3):219-24.
- 91) Batsakis JG, Rice DH, Solomon AR. The pathology of head and neck tumors: squamous and mucous-gland carcinomas of the nasal cavity, paranasal sinuses, and larynx, part 6. *Head Neck Surg.* 1980 Jul-Aug;2(6):497-508.
- 92) Batsakis JG. Surgical margins in squamous cell carcinomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1988 Mar-Apr;97(2 Pt 1):213-4.

- 93) Ganly I, Patel SG, Singh B, Kraus DH, Bridger PG, Cantu G, Cheesman A, De Sa G, Donald P, Fliss D, Gullane P, Janecka I, Kamata SE, Kowalski LP, Levine P, Medina LR, Pradhan S, Schramm V, Snyderman C, Wei WI, Shah JP. Complications of craniofacial resection for malignant tumors of the skull base: report of an International Collaborative Study. *Head Neck*. 2005 Jun;27(6):445-51.
- 94) Loree TR, Strong EW. Significance of positive margins in oral cavity squamous carcinoma. *Am J Surg*. 1990 Oct;160(4):410-4.
- 95) Dulguerov P, Jacobsen MS, Allal AS, Lehmann W, Calcaterra T. Nasal and paranasal sinus carcinoma: are we making progress? A series of 220 patients and a systematic review. *Cancer*. 2001 Dec 15;92(12):3012-29.
- 96) Conley J, Dingman DL. Adenoid cystic carcinoma in the head and neck (cylindroma). *Arch Otolaryngol*. 1974 Aug;100(2):81-90.
- 97) Horee W. Adenoid cystic carcinoma of the maxilla. *Arch Otolaryngol* 1974; 100:469-72.
- 98) Mattavelli et al. Carcinoma adenoido cistico: storia naturale e implicazioni Terapeutiche. In : veronesi U, Molinari R, Banfi A, Santoro A, eds. I tumori della testa e del collo. Milano: Casa Editrice Ambrosiana 1990: 201-3.
- 99) Ohngren LG. Malignant tumours of the maxillo-ethmoidal region. *Acta Otolaryngologica* 1993; 19: 323-34.
- 100) Sebileau P. Les formes cliniques du Cancer du sinus maxillarie. *Annales malades d'oreille, du larynx, nez et pharynx*. 1906 ;32:430-50.
- 101) Hopkin N, McNicoll W, Dalley VM, Shaw HJ. Cancer of the paranasal sinuses and nasal cavities. Part I. Clinical features. *J Laryngol Otol*. 1984 Jun;98(6):585-95.
- 102) Robin PE, Powell DJ, Stansbie JM. Carcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses: incidence and presentation of different histological types. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1979 Dec;4(6):431-56.
- 103) Wustrow J, Rudert H, Diercks M, Beigel A. Squamous epithelial carcinoma and undifferentiated carcinoma of the inner nose and paranasal sinuses. *Strahlenther Onkol*. 1989 Jun;165(6):468-73.
- 104) Saunders SH, Ruff T. Adenocarcinoma of the para-nasal sinuses. *J Laryngol Otol*. 1976 Feb;90(2):157-66.
- 105) Saber AT, Nielsen LR, Dictor M, Hagmar L, Mikoczy Z, Wallin H. K-ras mutations in sinonasal adenocarcinomas in patients occupationally exposed to wood or leather dust. *Cancer Lett*. 1998 Apr 10;126(1):59-65.
- 106) Pérez P, Dominguez O, González S, González S, Triviño A, Suárez C. ras gene mutations in ethmoid sinus adenocarcinoma: prognostic implications. *Cancer*. 1999 Jul 15;86(2):255-64.
- 107) Perrone F, Oggionni M, Birindelli S, Suardi S, Tabano S, Romano R, Moiraghi ML, Bimbi G, Quattrone P, Cantu G, Pierotti MA, Licitra L, Pilotti S. TP53, p14ARF, p16INK4a and H-ras gene molecular analysis in intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Int J Cancer*. 2003 Jun 10;105(2):196-203.

- 108) Korinth D, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N, Hattenberger S, Bockmühl U, Dietel M, Schroeder HG, Donhuijsen K, Petersen I. Chromosomal imbalances in wood dust-related adenocarcinomas of the inner nose and their associations with pathological parameters. *J Pathol.* 2005 Oct;207(2):207-15.
- 109) Lopez JI, Nevado M, Eizaguirre B, Perez A. Intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. A clinicopathologic study of 6 cases. *Tumori.* 1990 Jun 30;76(3):250-4.
- 110) Kleinsasser O, Schroeder HG. Adenocarcinomas of the inner nose after exposure to wood dust. Morphological findings and relationships between histopathology and clinical behavior in 79 cases. *Arch Otorhinolaryngol.* 1988;245(1):1-15.
- 111) Leclerc A, Martinez Cortes M, Gerin M, Luce D, Brugere J. Sinonasal cancer and wood dust exposure: results from a case-control study. *Am J Epidemiol.* 1994 Aug 15;140(4):340-9.
- 112) Stellman SD, Demers PA, Colin D, Boffetta P. Cancer mortality and wood dust exposure among participants in the American Cancer Society Cancer Prevention Study-II (CPS-II). *Am J Ind Med.* 1998 Sep;34(3):229-37.
- 113) Hadfield EH. A study of adenocarcinoma of the paranasal sinuses in woodworkers in the furniture industry. *Ann R Coll Surg Engl.* 1970 Jun;46(6):301-19.
- 114) . Klintenberg C, Olofsson J, Hellquist H, Sokjer H. Adenocarcinoma of the ethmoid sinuses. A review of 28 cases with special reference to wood dust exposure. *Cancer.* 1984 Aug 1;54(3):482-8.
- 115) Barnes L. Intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Am J Surg Pathol.* 1986 Mar;10(3):192-202.
- 116) Mills SE, Fechner RE, Cantrell RW. Aggressive sinonasal lesion resembling normal intestinal mucosa. *Am J Surg Pathol.* 1982 Dec;6(8):803-9.
- 117) Kleinsasser O, Schroeder HG. Adenocarcinomas of the inner nose after exposure to wood dust. Morphological findings and relationships between histopathology and clinical behavior in 79 cases. *Arch Otorhinolaryngol.* 1988;245(1):1-15.
- 118) Resto VA, Krane JF et al. Immunoistochemical distinction of intestinal-type adenocarcinoma from metastatic adenocarcinoma of intestinal origin. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2006 Jan ; 115(1) : 59-64.
- 119) Franchi A, Gallo O, Santucci M. Clinical relevance of the histological classification of sinonasal intestinal-type adenocarcinomas. *Hum Pathol.* 1999 Oct;30(10):1140-5.
- 120) D. Fiaux–Camous, S. Chevret, N. Oker, M. Turri–Zanoni, D. Lombardi, O. Choussy, D. Frederic, M. Jorissen, L. de Gabory, O. Malard, P. Herman, P. Nicolai, P. Castelnuovo, FD. Benjamin Verillaud. Prognostic value of the seventh AJCC/UICC TNM classification of intestinal-type ethmoid adenocarcinoma: Systematic review and risk prediction model. *Head & Neck* 2017; 39(4):668-678..
- 121) G Maccariello, A. Deganello, O. Choussy, O. Gallo, D. Vitali, D. De Raucourt, C. Georgalas. Endoscopic nasal versus open approach for the management of sinonasal adenocarcinoma: a pooled-analysis of 1826 patients. *Head & Neck* 2016 Apr;38 Suppl 1:E2267-74.
- 122) Franchi A, Gallo O, Santucci M. Clinical relevance of the histological classification of sinonasal intestinal-type adenocarcinomas. *Hum Pathol.* 1999 Oct;30 (10):1140-5.

- 123) Gallo O, Franchi A et al. Prognostic significance of c-erbB-2 oncoprotein expression in intestinal-type adenocarcinoma of the sinonasal tract. *Head Neck*. 1998 May;20(3):224-31.
- 124) McKinney CD, Mills SE, Franquemont DW. Sinonasal intestinal-type adenocarcinoma: immunohistochemical profile and comparison with colonic adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 1995 May;8(4):421-6.
- 125) 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.
- 126) Gregor Obernosterer, Philipp J.F. Leuschner, Mattias Alenius, Javier Martinez Post-transcriptional regulation of microRNA expression *RNA*. 2006 Jul; 12(7): 1161–1167. doi: 10.1261/rna.2322506
- 127) Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. 2006 Mar;22(3):165-73
- 128) Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 2006 13:1097-101.
- 129) Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281–97.
- 130) 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
- 131) Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297
- 132) Shyu, AB et All. (2008). Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. *Embo J*. 27, 471-481t
- 133) 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
- 134) Gregory RI, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res*. 2005 May 1;65(9):3509-12.
- 135) 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.
- 136) Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, Morgan DL, Postier RG, Brackett DJ, Schmittgen TD. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2007;120:1046–54.
- 137) 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.
- 138) 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.

- 139) 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.
- 140) 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*.
- 141) 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
- 142) 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.
- 143) 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.
- 144) Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjörn M, Hansen H, Berger U, Gullans S, Kearney P, Sarnow P, Straarup E and Kauppinen S. (2008). *Nature*, 452, 896-899
- 145) Al-Kafaji G, Al-Naieb ZT, Bakhiet M. Increased oncogenic microRNA-18a expression in the peripheral blood of patients with prostate cancer: A potential novel non-invasive biomarker. *Oncol Lett*. 2016;11:1201–1206.
- 146) Hui Wang, Zheqiong Tan, Hui Hu, Hongzhou Liu, Tangwei Wu, Chao Zheng, Xiuling Wang, Zhenzhao Luo, Jing Wang, Shuiyi Liu, Zhongxin Lu, Jiancheng Tu microRNA-21 promotes breast cancer proliferation and metastasis by targeting LZTFL1. *BMC Cancer*. 2019; 19: 738. Published online 2019 Jul 27. doi: 10.1186/s12885-019-5951-3
- 147) Zhang T, Jiang K, Zhu X, Zhao G, Wu H, Deng G, Qiu C. miR-433 inhibits breast cancer cell growth via the MAPK signaling pathway by targeting Rap1a. *Int J Biol Sci* 2018; 14(6):622-632. doi:10.7150/ijbs.24223
- 148) Re M, Magliulo G, Gioacchini FM, et al. Expression Levels and Clinical Significance of miR-21-5p, miR-let-7a, and miR-34c-5p in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Biomed Res Int*. 2017;2017:3921258. doi:10.1155/2017/3921258
- 149) Muriel Lizé , Alexander Klimke & Matthias Dobbelstein (2011) MicroRNA-449 in cell fate determination, *Cell Cycle*, 10:17, 2874-2882, DOI: 10.4161/cc.10.17.17181
- 150) *Nature*. 2014 June 5; 510(7503): 115–120. doi:10.1038/nature13413.
- 151) Benoît 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
- 152) Qin AY, Zhang XW, Liu L, Yu JP, Li H, Wang SZ, Ren XB, Cao S. MiR-205 in cancer: an angel or a devil? *Eur J Cell Biol*. 2013 Feb;92(2):54-60. doi: 10.1016/j.ejcb.2012.11.002.

- 153) Cao P, Zhou L, Zhang J, Zheng F, Wang H, Ma D, Tian J. Comprehensive Expression Profiling of microRNAs in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Head Neck* 2013 May;35(5):720-8. doi: 10.1002/hed.23011.
- 154) Yu J, Ryan DG, Getsios S, Oliveira-Fernandes M, Fatima A, Lavker RM. MicroRNA-184 Antagonizes microRNA-205 to Maintain SHIP2 Levels in Epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(49):19300-5. doi: 10.1073/pnas.0803992105.
- 155) Karaayvaz M, Zhang C, Liang S, Shroyer KR, Ju J. Prognostic Significance of miR-205 in Endometrial Cancer. *PLoS One*. 2012;7(4):e35158. doi: 10.1371/journal.pone.0035158.
- 156) Luo Z, Zhang L, Li Z, Li X, Li G, Yu H, Jiang C, Dai Y, Guo X, Xiang J, Li G. An in silico analysis of dynamic changes in microRNA expression profiles in stepwise development of nasopharyngeal carcinoma. *BMC Med Genomics*. 2012;5:3. doi: 10.1186/1755-8794-5-3.
- 157) Jing-Hua Li, Shan-Shan Sun, Ning Li, Peng Lv, Shu-Yang Xie and Ping-Yu Wang *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 54), pp: 91938-91949
- 158) Tomasz Kolenda, Kacper Guglas, Anna Teresiak, Renata Bliźniak, Katarzyna Lamperska *J Biomed Sci*. 2019; 26: 17. Published online 2019 Feb 13. doi: 10.1186/s12929-019-0511-3 PMCID: PMC6373017
- 159) Mills SE, Fechner RE, Cantrell RW. Aggressive sinonasal lesion resembling normal intestinal mucosa. *Am J Surg Pathol*. 1982 Dec;6(8):803-9.
- 160) Batsakis JG, Mackay B, Ordonez NG. Enteric-type adenocarcinoma of the nasal cavity. An electron microscopic and immunocytochemical study. *Cancer*. 1984 Sep 1;54(5):855-60.
- 161) McKinney CD, Mills SE, Franquemont DW. Sinonasal intestinal-type adenocarcinoma: immunohistochemical profile and comparison with colonic adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 1995 May;8(4):421-6.
- 162) Franchi A, Massi D, Baroni G, Santucci M. CDX-2 homeobox gene expression. *Am J Surg Pathol*. 2003 Oct;27(10):1390-1.
- 163) Saber AT, Nielsen LR, Dictor M, Hagmar L, Mikoczy Z, Wallin H. K-ras mutations in sinonasal adenocarcinomas in patients occupationally exposed to wood or leather dust. *Cancer Lett*. 1998 Apr 10;126(1):59-65.
- 164) Perez P, Dominguez O, Gonzalez S, Trivino A, Suarez C. ras gene mutations in ethmoid sinus adenocarcinoma: prognostic implications. *Cancer*. 1999 Jul 15;86(2):255-64.
- 165) Wu TT, Barnes L, Bakker A, Swalsky PA, Finkelstein SD. K-ras-2 and p53 genotyping of intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Mod Pathol*. 1996 Mar;9(3):199-204.
- 166) Perrone F, Oggionni M, Birindelli S, Suardi S, Tabano S, Romano R, Moiraghi ML, Bimbi G, Quattrone P, Cantu G, Pierotti MA, Licitra L, Pilotti S. TP53, p14ARF, p16INK4a and H-ras gene molecular analysis in intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Int J Cancer*. 2003 Jun 10;105(2):196-203.
- 167) Re M, Magliulo G, Tarchini P, Mallardi V, Rubini C, Santarelli A, Lo Muzio L. p53 and BCL-2 over-expression inversely correlates with histological differentiation in occupational ethmoidal intestinal-type sinonasal adenocarcinoma. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011 Jul-Sep;24(3):603-9.

- 168) Gallo O, Franchi A, Fini-Storchi I, Cilento G, Boddi V, Boccuzzi S, Urso C. Prognostic significance of c-erbB-2 oncoprotein expression in intestinal-type adenocarcinoma of the sinonasal tract. *Head Neck*. 1998 May;20(3):224-31.
- 169) Re M, Santarelli A, Mascitti M, Bambini F, Lo Muzio L, Zizzi A, Rubini C. Trail overexpression inversely correlates with histological differentiation in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma. *Int J Surg Oncol* 2013;2013:203873.
- 170) Tomassetti M, Re M, Monaco F, Gaetani S, Rubini C, Bertini A, Pasquini E, Bersaglieri C, Bracci M, Staffolani S, Colomba M, Gregorini A, Valentino M, Tagliabracci A, Bovenzi M, Neuzil J, Amati M, Santarelli L. MiR-126 in intestinal-type sinonasal adenocarcinomas: exosomal transfer of MiR-126 promotes anti-tumour responses. *BMC Cancer* 2018 Sep 17;18(1):896.
- 171) Re M, Magliulo G, Ferrante L, Zizzi A, Santarelli A, Stramazzotti D, Lo Muzio L, Goteri G, Rubini C. p63 expression in laryngeal squamous cell carcinoma is related to tumor extension, histologic grade, lymph node involvement and clinical stage. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2013 Jan-Feb;27(1):121-9.
- 172) Re M, Zizzi A, Ferrante L, Stramazzotti D, Goteri G, Gioacchini FM, Olivieri F, Magliulo G, Rubini C. p63 and Ki-67 immunostainings in laryngeal squamous cell carcinoma are related to survival. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2014 Jun;271(6):1641-51.
- 173) Re M, Ceka A, Rubini C, Ferrante L, Zizzi A, Gioacchini FM, Tulli M, Spazzafumo L, Sellari-Franceschini S, Procopio AD, Olivieri F. MiR-34c-5p is related to recurrence in squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2015 Sep; 125(9): E306-12.
- 174) Lucarini G, Zizzi A, Re M, Sayeed MA, Di Primio R, Rubini C. Prognostic implication of CEACAM1 expression in squamous cell carcinoma of the larynx: pilot study. *Head Neck* 2019;41(6):1615-1621.
- 175) Re M, Gioacchini FM, Scarpa A, Cassandro C, Tulli M, Cassandro E. The prognostic significance of E-cadherin expression in laryngeal squamous cell carcinoma: a systematic review. *Acta Otorhinolaryngologica Italica* 2018 Dec; 38(6):504-510.
- 176) Re M, Magliulo G, Gioacchini FM, Bajraktari A, Bertini A, Ceka A, Rubini C, Ferrante L, Procopio AD, Olivieri F. Expression levels and clinical significance of miR-21-5p, miR-let-7°, and miR-34c-5p in laryngeal squamous cell carcinoma. *Biomed Res Int* 2017, Article ID 3921258, 9 pages.
- 177) Re M, Gioacchini FM, Bajraktari A, Tomassetti M, Kaleci S, Rubini C, Bertini A, Magliulo G, Pasquini E. Malignant transformation of sinonasal inverted papilloma and related genetic alterations: a systematic review. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2017 Aug.; 274(8); 2991-3000.
- 178) Gioacchini FM, Alicandri-Ciufelli M, Rubini C, Magliulo G, Re M. Prognostic value of Bcl-2 expression in squamous cell carcinoma of the larynx: a systematic review. *Int J Biol Markers* 2015 May 26;30(2):e155-60.
- 179) Gioacchini FM, Alicandri-Ciufelli M, Kaleci S, Magliulo G, Presutti L, Re M. The prognostic value of Cyclin D1 expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2016 Apr;273(4):801-809.
- 180) Gioacchini FM, Alicandri-Ciufelli M, Magliulo G, Rubini C, Presutti L, Re M. The clinical relevance of Ki-67 expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2015 Jul;272(7):1569-76.

- 181)Re M, Magliulo G, Salvolini E, Orciani M, Gioacchini FM, Goteri G, Rubini C. Prognostic significance of p53 and KAI-1 expression in patients with Laryngeal squamous cell carcinoma. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 2010;(32)5:247-253.
- 182). Fan CY. Epigenetic alterations in head and neck cancer: prevalence, clinical significance, and implications. *Curr Oncol Rep* 2004;6:152-161.
- 183)Marsit CJ, Christensen BC, Houseman EA et al. Epigenetic profiling reveals etiologically distinct patterns of DNA methylation in head and neck squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2009;30:416-422.
- 184)Worsham MJ, Chen KM, Meduri V et al. Epigenetic events of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;132:668-677.
- 185)Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;431:350-355.
- 186)Zamore PD and Haley B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science* 2005;309:1519-1524.
- 187)Schickel R, Boyerinas B, Park SM, Peter ME. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene* 2008; 27:5959-5974.
- 188)Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell* 2004; 16:861-865.
- 189)Avissar M, McClean MD, Kelsey KT, Marsit CJ. MicroRNA expression in head and neck cancer associates with alcohol consumption and survival. *Oxford University Press* 2009;30:2059-2063.
- 190)Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med* 2005; 353:1768-1771.
- 191)Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65:7065-7070.
- 192) Calin GA, Ferracin M, Cimmino A et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005;353:1793-1801.
- 193)Yan LX, Huang XF, Shao Q et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA* 2008;14:2348-2360.
- 194)Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 2008;299:425-436.
- 195)Chen, Y and Stallings RL. Differential patterns of microRNA expression in neuroblastoma are correlated with prognosis, differentiation, and apoptosis. *Cancer Res* 2007;67:976-983.
- 196)Avissar M, Christensen BC, Kelsey KT, Marsit CJ. MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009;15:2850-2855.
- 197)Chang SS, Jiang WW, Smith I et al. MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2008;123:2791-2797.
- 198)Childs G, Fazzari M, Kung G et al. Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 2009;174:736-745.

- 199) Ramdas L, Giri U, Ashorn CL et al. miRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue. *Head Neck* 2009;31:642-654.
- 200) Braicu C, Buiga R, Cojocneanu R, Buse M, Raduly L, Pop LA, Chira S, Budisan L, Jurj A, Ciocan C, Magdo L, Irimie A, Dobrota F, Petrut B, Berindan-Neagoe I. Connecting the dots between different networks: miRNAs associated with bladder cancer risk and progression. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019 Oct 29;38(1):433. doi: 10.1186/s13046-019-1406-6.
- 201) Michael Traeger M, Rehkaemper J, Ullerich H, Steinestel K, Wardelmann E, Senninger N, Abdallah Dhayat S. The ambiguous role of microRNA-205 and its clinical potential in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018 Dec;144(12):2419-2431. doi: 10.1007/s00432-018-2755-9.
- 202) Li JH, Sun SS, Li N, Lv P, Xie SY, Wang PY. MiR-205 as a promising biomarker in the diagnosis and prognosis of lung cancer. *Oncotarget*. 2017 Aug 14;8(54):91938-91949. doi: 10.18632/oncotarget.20262.
- 203) Xiao Y, Humphries B, Yang C, Wang Z. MiR-205 Dysregulations in Breast Cancer: The Complexity and Opportunities. *Noncoding RNA*. 2019 Nov 19;5(4):53. doi:10.3390/ncrna5040053.
- 204) Song CJ, Chen H, Chen LZ, Ru GM, Guo JJ, Ding QN. The potential of microRNAs as human prostate cancer biomarkers: A meta-analysis of related studies. *J Cell Biochem*. 2018;119(3):2763-2786. doi: 10.1002/jcb.26445.
- 205) Hanna JA, Hahn L, Agarwal S, Rimm DL. In situ measurement of miR-205 in malignant melanoma tissue supports its role as a tumor suppressor microRNA. *Lab Invest*. 2012 Oct;92(10):1390-7. doi: 10.1038/labinvest.2012.119.
- 206) Zhuang SH, Xiu L, Elsayed YA. Overall survival: a gold standard in search of a surrogate: the value of progression-free survival and time to progression as end points of drug efficacy. *Cancer J* 2009; 15: 395-400.
- 207) Lizé M, Klimke A, Döbelstein M. MicroRNA-449 in cell fate determination. *Cell Cycle*. 2011;10(17):2874-82. doi: 10.4161/cc.10.17.17181.
- 208) 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.
- 209) 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.
- 210) 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- κ B Signaling Pathway. *Oncol Res*. 2019 Feb 5;27(2):227-235. doi: 10.3727/096504018X15213089759999.
- 211) 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/anticancer.13414.

- 212)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.
- 213)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.
- 214)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.
- 215)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.
- 216)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.
- 217)Ji C, Xu Q, Guo L, Wang X, Ren Y, Zhang H, Zhu W, Ming Z, Yuan Y, Ren X, Song J, Cheng Y, Yang J, Zhang Y. eEF-2 Kinase-targeted miR-449b confers radiation sensitivity to cancer cells. *Cancer Lett*. 2018 Apr 1;418:64-74. doi: 10.1016/j.canlet.2018.01.014.