



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**  
**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**  
**DOTTORATO DI RICERCA IN ONCOLOGIA E ONCOLOGIA**  
**CHIRURGICA**  
**XXIII ciclo**

**ESPRESSIONE DI MASPINA, SUA LOCALIZZAZIONE**  
**SUB-CELLULARE E RAPPORTO CON LA**  
**NEOANGIOGENESI**  
**NEL CARCINOMA LARINGEO**

**Direttore della Scuola:** Ch.ma Prof.ssa Paola Zanovello

**Tutor:** Egr. Dott. Gino Marioni

**Dottorando:** Dott. Giancarlo Ottaviano

# INDICE

## 1 INTRODUZIONE

*Pag.5*

### *1.1 IL CARCINOMA DELLA LARINGE*

*Epidemiologia*

*Fattori prognostici*

*Fattori relativi all'ospite*

*Fattori relativi alla neoplasia*

*Fattori relativi alla modalità di trattamento*

*Markers molecolari*

### *1.2 NEOANGIOGENESI*

*Pag. 11*

### *1.3 MASPINA E NEOANGIOGENESI*

*Pag. 16*

### *1.4 ANGIOGENINA*

*Pag. 18*

### *1.5 CD105 – ENDOGLINA*

*Pag. 21*

### *1.6 IMPORTANZA DEI PRINCIPALI*

### *MARCATORI ANGIOGENICI*

*Pag. 22*

*MVD*

*Target therapy*

## 2 SCOPO DELLO STUDIO

*Pag. 26*

### 3 MATERIALI E METODI

Pag. 27

*Pazienti*

*Preparazione del materiale*

*Immunoistochimica per Maspina*

*Immunoistochimica per Angiogenina*

*Immunoistochimica per CD105*

*Analisi d'immagine*

*Analisi statistica*

### 4 RISULTATI

Pag. 33

*Outcome clinico e Follow-up*

*Parametri clinico-patologici e prognosi*

*Pattern di espressione di Maspina (nucleare-non nucleare)  
e parametri clinico-patologici*

*Pattern di espressione di Maspina e fattori prognostici*

*Espressione di Maspina nucleare e parametri clinico-  
patologici*

*Relazione tra percentuale d'espressione di Angiogenina nelle  
cellule di carcinoma ed espressione di Angiogenina nelle  
cellule endoteliali dei vasi neoplastici e parametri clinico-  
patologici e prognostici*

*Relazione tra l'espressione di CD105 e i parametri clinico-  
patologici e prognostici*

*Relazione tra il pattern d'espressione di Maspina, la  
percentuale di espressione nucleare Maspina e l'espressione  
di CD105 ed Angiogenina*

*Relazione tra l'espressione di Angiogenina e quella di CD105*

*Analisi della sottopopolazione di pazienti studiati senza  
invasione linfonodale (N0)*

**5 DISCUSSIONE** *Pag. 39*

**6 CONCLUSIONI** *Pag. 46*

**BIBLIOGRAFIA** *Pag. 47*

**APPENDICE** *Pag. 66*

*Tabelle*

*Grafici*

*Figure*

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 IL CARCINOMA DELLA LARINGE

### *Epidemiologia*

I tumori maligni della laringe rappresentano circa il 2-5% di tutte le neoplasie maligne dell'uomo e sono, assieme al cavo orale, la neoplasia maligna più frequente della regione testa-collo.

Il carcinoma squamoso della laringe ha un'incidenza di circa 121.000 nuovi casi per anno. In Italia il carcinoma della laringe ha un tasso di incidenza di circa 19,8 casi per 100.000 abitanti maschi e di circa 1,5 casi per 100.000 abitanti femmine (Tavani et al, 1994).

### *Fattori prognostici*

I fattori che possono condizionare la prognosi dei pazienti affetti da carcinoma squamoso della laringe possono essere suddivisi in:

#### Fattori relativi all'ospite

Le *condizioni generali* del paziente che sono definite dal performance status e possono essere influenzate negativamente dalla presenza di eventuali comorbidità.

Lo *stato nutrizionale* è rilevante dal momento che influenza la risposta immunologica. Un bilancio azotato negativo sembra poter influire negativamente sulla prognosi del paziente (Stell et al, 1990).

#### Fattori relativi alla neoplasia

La *sede* del tumore primitivo è importante in quanto, per esempio, la localizzazione sovraglottica è caratterizzata da una prognosi peggiore rispetto a quella glottica. I carcinomi a sede sottoglottica inoltre, tendendo a

manifestarsi clinicamente in stadi più tardivi, si associano ad una prognosi più severa. (1.Ferlito e Bailey, 1993).

*La stadiazione TNM.*

Il *grading* istopatologico secondo cui si distinguono lesioni ben differenziate (G1), moderatamente differenziate (G2) e scarsamente differenziate (G3): tale classificazione si basa sull'insorgenza di pleomorfismo e ipercromasia nucleare, sull'aumento del numero e delle atipie delle mitosi, sulla diminuzione della cheratinizzazione, sull'alterata stratificazione cellulare ed infine sulla perdita delle giunzioni intercellulari e della normale morfologia cellulare.

*La presenza di una seconda neoplasia*, sincrona o metacrona, influenza significativamente la prognosi di un paziente con carcinoma laringeo arrivando a dimezzare la sopravvivenza del paziente con carcinoma laringeo (2.Ferlito e Bailey, 1993).

#### Fattori relativi alla modalità di trattamento

Il cancro della laringe, se non trattato, conduce inevitabilmente a exitus. Indipendentemente dal tipo di trattamento adottato, i carcinomi laringei in fase T<sub>is</sub>, T1, T2 hanno una probabilità di guarigione che va dall'80% al 90%. Diversamente, nei tumori in fase avanzata la probabilità di guarigione scende al di sotto del 60% (1.Ferlito e Bailey, 1993). Chirurgia e radioterapia sono i trattamenti più comunemente adottati. La scelta tra trattamento radioterapico o chirurgico dipende da vari fattori tra cui l'età del paziente e le sue condizioni fisiche generali, la compliance e la presenza di eventuali comorbidità. Altri fattori sono legati alla malattia neoplastica, tra cui la sede della neoplasia nel contesto della laringe, l'infiltrazione di strutture contigue, lo stadio, la

presenza di metastasi linfonodali o a distanza, l'istotipo, l'eventuale pregressa radioterapia o chirurgia e un loro eventuale fallimento, la storia naturale della neoplasia. Frequentemente chirurgia, radioterapia e chemioterapia vengono combinate per il trattamento delle neoplasie maligne della laringe. La radioterapia è, infatti, spesso utilizzata come trattamento adiuvante la chirurgia, mentre la chemioterapia può essere impiegata in maniera neoadiuvante alla chirurgia o alla radioterapia nelle forme caratterizzate da rapido accrescimento o nei carcinomi molto estesi. (Laccourreye et al,1999) Può essere inoltre eseguita dopo le altre modalità di trattamento (coadiuvante) con lo scopo di garantire la preservazione d'organo nei pazienti con cancro localmente avanzato della laringe e prevenire le eventuali metastasi a distanza nei casi ad alto rischio (Forastiere et al, 2006). Attualmente la combinazione di Cisplatino e Fluorouracile sembra mostrare un lieve ma significativo miglioramento nell'outcome, con una percentuale di risposte obiettive dell'ordine dell'85% e un 35-50% di risposte cliniche complete. Inoltre, questa procedura non preclude la fattibilità sia della chirurgia che della radioterapia post-operatoria (Licitra et al, 2003).

Nel caso di recidiva loco-regionale dopo trattamento radio-chemioterapico, vi è indicazione ad eseguire un trattamento chirurgico di salvataggio (Leon et al, 2001; 1.Marioni et al, 2006; Farrag et al, 2006).

### Markers molecolari

E' noto che pazienti oncologici del tutto analoghi per i parametri clinici ed anatomo-patologici abbiano spesso una prognosi

differente (Golousinski et al, 1999). Da questa considerazione deriva la necessità di riuscire a distinguere in modo indipendente dalle caratteristiche cliniche ed istologiche convenzionali quei casi che hanno una prognosi peggiore e quindi una maggiore probabilità di recidiva, affinché possano essere sottoposti ad una terapia più mirata ed aggressiva. Numerosi sono gli studi in letteratura che hanno come oggetto proteine, peptidi, geni, porzioni cromosomiali a livello del tessuto neoplastico la cui espressione potrebbe correlare con il comportamento biologico della malattia. Vengono scelte a questo scopo molecole di cui è nota la funzione nella regolazione dello sviluppo delle cellule normali e neoplastiche. Esse possono essere divise in 3 grandi categorie: proto-oncogeni, fattori di crescita e oncosoppressori.

I **protooncogeni** sono geni che codificano per proteine in grado di stimolare la proliferazione cellulare. Una mutazione a livello di un protooncogene può portare alla formazione di un oncogene, dalla cui trascrizione derivano proteine alterate. Tali proteine continuano ad attivare la proliferazione cellulare senza però rispondere agli stimoli inibitori che normalmente controllano il ciclo cellulare. Mutazioni a carico di un protooncogene hanno carattere dominante. Uno tra i protooncogeni più studiati è quello codificante per la ciclina D1. La *ciclina D1* forma, assieme alle chinasi ciclino dipendenti cdk4 e cdk6, un complesso che agisce fosforilando la proteina RB: ciò comporta la progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S. L'iperespressione del gene codificante per la ciclina D1 sembrerebbe correlare con una peggiore prognosi del carcinoma della laringe (Fracchiolla et al, 1997).



Gli **oncosoppressori** sono geni che codificano per proteine inibenti la proliferazione cellulare la cui mutazione presenta un carattere recessivo. Tra gli oncosoppressori quello che ha attratto maggiormente l'interesse del mondo scientifico è il gene che codifica per la *p53*. Questa molecola agisce infatti a vari livelli inibendo il ciclo cellulare, promuovendo l'apoptosi di cellule con danni genomici conseguenti all'esposizione a radiazioni o chemioterapia e controllando la trascrizione del materiale genetico.

Più recentemente l'interesse della ricerca si è spostato sulla proteina *p27*. Essa inibisce la progressione del ciclo dalla fase G1 alla fase S mediante il legame con il complesso ciclina-chinasi ciclino dipendente. Elevate espressioni di *p27* sono state preliminarmente correlate con una prognosi migliore nel caso dei carcinomi squamosi laringei (Calgaro et al, 2007).

La *Maspina*, proteina appartenente alla superfamiglia delle serpine, è il prodotto di un gene oncosoppressore. Maggiori livelli di *Maspina* sono correlati con assenza di metastasi di carcinoma squamocellulare laringeo a livello linfonodale, con un maggiore sopravvivenza libera da malattia, un minore tasso di recidiva e, in generale, con una migliore prognosi (I. Marioni et al, 2005).

I **fattori di crescita** sono molecole in grado di stimolare la proliferazione cellulare. In questa famiglia possono essere annoverati Endotelial Growth Factor Receptor (EGFR), il Vascular Epitelial Growth Factor (VEGF) ed altri.

EGFR è una glicoproteina trans-membrana di circa 170 KD che appartiene alla classe dei recettori della tirosin-chinasi. Sebbene il segnale proveniente da EGFR sia essenziale per lo sviluppo e l'omeostasi dei tessuti normali, l'attività di membri di questa

famiglia di recettori gioca un ruolo chiave nello sviluppo e nella crescita delle cellule tumorali. I livelli di *EGFR* sembrano, infatti, essere direttamente correlati con la severità della malattia nei carcinomi della testa e del collo potendo, l'attivazione di EGFR, stimolare la proliferazione, l'angiogenesi, la protezione dall'apoptosi, la perdita di differenziazione, la migrazione e l'invasione, tutti elementi essenziali nello sviluppo delle neoplasie maligne (Cheng et al, 2004).

*VEGF* è un fattore proteico secreto dalle cellule ipossiche che agisce con meccanismo paracrino stimolando le cellule endoteliali e dunque l'angiogenesi anche nelle cellule neoplastiche (Riedel et al, 2000).

## ***1.2 NEOANGIOGENESI***

La neoangiogenesi neoplastica, ovvero il processo di formazione di nuovi vasi ematici peritumorali e intratumorali, è fondamentale per la crescita dei tumori maligni solidi. Per la prima volta nel 1992, Folkman dimostrò che, a differenza dell'angiogenesi fisiologica dove i vasi hanno un aspetto ordinato e sono sufficientemente vicini da poter ossigenare tutto il parenchima circostante, nei tessuti neoplastici i vasi sono tortuosi e dilatati, hanno pareti vascolari incomplete, numerose anastomosi artero-venose e restringimenti che ne rendono irregolare il flusso determinando anche consistenti riduzioni dell'apporto di ossigeno con conseguenti zone di ipossia tra i vasi. L'angiogenesi include diverse fasi che sono la migrazione cellulare, la degradazione della matrice extra-cellulare, la proliferazione cellulare, la differenziazione, la formazione di anastomosi tra i nuovi microvasi e la riorganizzazione strutturale (Cheng et al, 2004; Dales et al, 2004). Durante la neoangiogenesi, i vasi si sviluppano mediante due meccanismi principali: la gemmazione o l'intussuscezione. La prima è caratterizzata dallo sviluppo di una rete vascolare a partenza da gemme di cellule endoteliali dei vasi adiacenti alla massa tumorale e costituisce il processo angiogenetico vero e proprio. Il secondo è caratterizzato dal rimodellamento e dall'espansione del lume dei vasi pre-esistenti in seguito all'infiltrazione di colonne di tessuto interstiziale (Risau, 1997). Nell'adulto l'angiogenesi è un processo che avviene fisiologicamente nel sistema riproduttivo femminile ed è regolato dagli ormoni ovarici. Alcune condizioni fisiopatologiche, tra cui la crescita neoplastica, possono attivare l'angiogenesi. L'osservazione che la neoangiogenesi abbia luogo durante la crescita neoplastica risale già ai primi anni del secolo scorso, mentre l'ipotesi che il

tumore sia in grado di produrre autonomamente fattori capaci di stimolare l'angiogenesi è molto più recente. Solo nel 2000, infatti, Carmeliet e Jain hanno dimostrato che l'angiogenesi è una tappa fondamentale del graduale processo che porta alla cancerogenesi. La crescita di un tumore solido, infatti, vede il passaggio da una fase avascolarizzata ad una vascolarizzata. Nella prima, il tumore ha dimensioni limitate e non supera i 2-3 mm di diametro. Successivamente, la neoplasia maligna avvia un processo di angiogenesi che porta alla formazione di neovasi che, inoltrandosi nel contesto della massa tumorale, le consentono di ingrandirsi e di metastatizzare (Figura 1). È largamente accettato dalla comunità scientifica che la neoangiogenesi si attivi quando l'azione dei fattori molecolari pro-angiogenetici non risulti controbilanciata da quella dei fattori molecolari anti-angiogenetici (Hanahan, 2000).

Nel processo di cancerizzazione, l'attivazione dell'angiogenesi è prodotta dalla cellula tumorale mutata mediante l'attivazione di oncogeni o l'inibizione di oncosoppressori coinvolti nel processo angiogenico (Carmeliet e Jain, 2000). Di conseguenza si ha l'espressione di un fattore di crescita sia per le cellule endoteliali (effetto paracrino) che per le stesse cellule tumorali (effetto autocrino). Verificandosi quindi uno sbilanciamento tra fattori proangiogenici e antiangiogenici che porta all'attivazione dell'angiogenesi (Dworak, 1986). L'inizio del processo angiogenico vede l'attivazione di cellule competenti tra cui cellule endoteliali, monociti, macrofagi, piastrine, mastociti e altri leucociti cui segue il rilascio di svariati fattori di crescita e citochine.

E' noto che, in cosanguenza della neoangiogenesi, le cellule endoteliali dei vasi tumorali proliferano da 20 a 2000 volte più rapidamente rispetto alle cellule endoteliali quiescenti dei vasi dei

tessuto normali (Hobson e Denekamp, 1984; Carmeliet e Jain, 2000). In Tabella 1 sono riportati i fattori di regolazione dell'angiogenesi ad oggi identificati. Tra quelli stimolatori rientrano diversi fattori di crescita, di cui i più importanti sono il Fibroblast Growth Factor (FGF), il VEGF, alcuni ormoni e citochine. Tra gli inibitori rientrano alcuni peptidi come l'Endostatina e l'Angiostatina, citochine ed ormoni (Desai e Ributti, 1999).

Alcuni fattori come VEGF hanno un ruolo specifico nell'attivazione della neo-angiogenesi, altri esercitano una duplice funzione fungendo da agonisti e da antagonisti. Il TGF- $\beta$  per esempio induce l'angiogenesi in vivo, ma la inibisce in vitro. Nell'ambito della neoangiogenesi tumorale, l'espressione di questi fattori non è ben organizzata a differenza di quanto accade nell'angiogenesi fisiologica (Carmeliet e Jain, 2000).

Il processo dell'Angiogenesi si può suddividere in quattro stadi:

- nel primo stadio si assiste all'aumento della permeabilità dei vasi pre-esistenti, dovuto ad una perdita delle connessioni tra le cellule endoteliali. Si ha, inoltre, vasodilatazione e formazione di organuli vescicovacuolari nelle cellule endoteliali. In questa prima fase il principale mediatore è VEGF;
- il secondo stadio è contraddistinto dalla migrazione e dalla proliferazione delle cellule endoteliali. La migrazione avviene secondo un gradiente di agenti chemiotattici rilasciati dalle cellule tumorali. In tale fase le cellule endoteliali attivate producono una speciale classe di enzimi proteolitici, le metalloproteasi della matrice (MMPs), che vengono rilasciate nei tessuti

- circostanti e depolimerizzano la matrice extracellulare, permettendo la migrazione delle cellule endoteliali stesse;
- il terzo stadio dell'angiogenesi corrisponde alla fase di differenziazione delle cellule endoteliali con l'arresto della proliferazione cellulare e la formazione di capillari primitivi che evolveranno gradualmente in una rete di vasi sanguigni maturi. Specifici effettori di questa fase sono VEGF, le Angiopoietine, Angiogenina, FGF, il Fattore di Crescita Epidermico (EGF), chemochine e IGF-1;
  - il quarto ed ultimo stadio, definito di maturazione funzionale, è caratterizzato dal riarrangiamento delle cellule endoteliali che si dispongono su più strati. Avviene il reclutamento di cellule mesenchimali periendotheliali di supporto, periciti e cellule muscolari lisce e la riorganizzazione delle interazioni cellulari, necessaria alla formazione del lume vascolare e alla stabilizzazione vascolare. In questa fase sono coinvolte diverse forme di VEGF e di Integrine (Tello-Montoliu et al, 2006).

I neo-vasi hanno maggiore permeabilità permettendo una più rapida disseminazione delle cellule tumorali per via linfatica o ematica. La diffusione in circolo delle cellule neoplastiche in distretti corporei distanti dalla neoplasia primitiva e la loro capacità di degradazione della matrice facilitano la fuoriuscita delle cellule tumorali dal vaso, la creazione di spazio per la crescita della nuova massa tumorale e l'innescò di un nuovo ciclo di neo-vascularizzazione. I vasi tumorali sono inoltre caratterizzati da anomalie ultrastrutturali e presentano per questo numerose fenestrature, vescicole e soluzioni di continuo,

giunzioni intercellulari lasche e membrane basali discontinue o assenti. Le cellule endoteliali inoltre non si dispongono, come di norma, le une affianco alle altre, bensì crescono sovrapponendosi parzialmente o completamente a quelle adiacenti, formando vegetazioni aggettanti nel lume vascolare. Il flusso ematico caotico e l'espressione non uniforme delle molecole di adesione spiegherebbe perché l'interazione tra leucociti e cellule endoteliali tumorali è scarsa. Inoltre, nella neoplasia la maturazione del sistema linfatico è altamente inefficiente tanto che i vasi linfatici sono pressoché assenti nel contesto della massa neoplastica, mentre risultano presenti e dilatati alla sua periferia. Tale condizione predispone chiaramente all'ingresso delle cellule metastatiche nel lume del vaso linfatico (Carmeliet e Jain, 2000).

L'iperpressione di VEGF è stata correlata con una maggior probabilità di metastasi a distanza per via ematica (Riedel et al, 2000). VEGF è una glicoproteina omodimerica che lega l'eparina e attualmente ne sono state identificate 4 isoforme denominate VEGF 121, VEGF 165, VEGF 189 e VEGF 205 in base al numero di amminoacidi. VEGF induce permeabilità vascolare permettendo la diffusione di proteine nell'interstizio e la migrazione delle cellule endoteliali (Veikkola and Alitalo, 2000).

Uno degli stimoli per la crescita della massa tumorale è rappresentato da un inadeguato apporto di sangue da parte delle strutture vascolari. La velocità di proliferazione delle cellule tumorali infatti spesso supera la capacità di sviluppo dei neo-vasi per cui lo spazio vascolare si riduce durante la crescita neoplastica con conseguente stato di ipossia (Fidler et al, 2002). Si attivano quindi dei meccanismi fisiologici indotti dall'ipossia che portano all'attivazione del fattore indotto dall'ipossia (HIF-1) che determina la trascrizione di numerosi

geni implicati nella neoangiogenesi vascolare, nell'invasione tumorale e nella metastatizzazione a distanza (Pungh e Ratcliffe, 2003).

Le cellule tumorali non solo producono fattori angiogenici, ma inducono anche molecole anti-angiogeniche. Per esempio l'angiostatina, l'endostatina, la trombospondina-1 (TSP), potenti inibitori dell'angiogenesi, sono indotti dalle neoplasie primitive o addirittura prodotte dalle cellule neoplastiche (Folkman, 1992).

### ***1.3 MASPINA E NEOANGIOGENESI***

La Maspina (inibitore della serpin-proteasi mammaria), è stata isolata e descritta per la prima volta nel 1994 da Zou e collaboratori. Fa parte della famiglia delle serpine ed agisce come inibitore della serin proteasi (Figura 2). Il gene che la codifica si trova a livello del cromosoma 18q21.3-q23 ed è formata da 376 amminoacidi con un peso molecolare di 42 kDa (Kim et al, 2003, Lockett et al, 2006). Si trova normalmente espressa nelle cellule epiteliali di mammella, placenta, prostata, timo, testicoli, cavo orale, intestino tenue, cute e cornea (1.Marioni et al, 2005). E' presente come proteina secreta, citoplasmatica, nucleare e di membrana (Lockett et al, 2006). Possiede molteplici funzioni biologiche e in particolare ha un'attività di oncosoppressore inibendo la crescita neoplastica, l'angiogenesi e la metastatizzazione tumorale (1.Marioni et al, 2006). Vari studi hanno evidenziato che Maspina è ipoespressa nelle cellule del carcinoma mammario invasivo e metastatizzante, inoltre la sua espressione risulta essere correlata ad una prognosi migliore nei carcinomi squamosi del cavo orale (Lockett et al, 2006). La localizzazione sub-cellulare di Maspina sembra inoltre cruciale per il suo ruolo di oncosoppressore come dimostrato da un recente studio di Marioni e collaboratori pubblicato nel 2006 (2.Marioni et al,2006) che hanno



trovato, studiando un gruppo di pazienti affetti da carcinoma della laringe, che Maspina nucleare era più espressa in quei pazienti con più bassa espressione di neoangiogenesi. Inoltre i pazienti senza storia di recidiva al follow-up avevano un'espressione di Maspina nucleare più alta di quelli con recidiva.

I meccanismi mediante i quali Maspina agisce sono complessi e tuttora non completamente compresi. Appare evidente che la sua localizzazione sub-cellulare sia associata ad un differente comportamento della neoplasia e a versatili funzioni biologiche (Lockett et al, 2006). E' stato dimostrato che Maspina interferisce con l'adesione cellulare alla membrana basale ed inibisce la motilità e l'invasività cellulare (Bass et al, 2002). La recente identificazione di proteine capaci di interagire con Maspina ha spostato l'interesse all'interno della cellula dove quest'ultima sembra rispondere a diversi stimoli come l'infiammazione ed il danno tissutale, regolando la trascrizione e legando proteine coinvolte nella risposta allo stress. E' stata dimostrata la partecipazione di Maspina nell'omeostasi cellulare, ove favorirebbe la differenziazione e, interagendo con il sistema GSH redox, regolerebbe il sistema antiossidante cellulare svolgendo così un importante ruolo di oncosoppressore (Bailey et al, 2006). E' stato dimostrato l'interessamento attivo della Maspina intracellulare nell'induzione dell'apoptosi cellulare (Lockett et al, 2006; Zhang et al, 2005). Maspina intracellulare sarebbe in grado, infatti, di sensibilizzare le cellule tumorali all'apoptosi. Un altro meccanismo mediante il quale Maspina sembra capace di ridurre la crescita neoplastica è quello d'inibire l'angiogenesi, mediante l'inibizione della migrazione verso VEGF e mediante la riduzione della proliferazione delle cellule endoteliali. (Zhang et al, 2000; Bailey et al, 2006).

### ***1.3 ANGIOGENINA***

L'Angiogenina (Figura 3) è una proteina dal peso molecolare di 14.1 kDa composta da 123 amminoacidi. Appartiene alla superfamiglia delle ribonucleasi (RNasiA) ed è stata per la prima volta isolata nelle cellule dell'adenocarcinoma del colon da Fett nel 1985 (Chen et al, 2006). Le Ribonucleasi sono enzimi che catalizzano l'idrolisi dell'acido Ribonucleico (RNA). La superfamiglia delle ribonucleasi, in base alle diverse proprietà strutturali, catalitiche e biologiche, può essere classificata in quattro sottofamiglie riportate in Tabella 2. La quarta sottofamiglia comprende le RNasi angiogenine. Le angiogenine hanno un'attività enzimatica essenziale poichè stimolano la formazione dei nuovi vasi sanguigni. Il gene che codifica per l'Angiogenina è presente in sede 14q11 (Gao e Xu, 2008).

Angiogenina durante lo sviluppo intrauterino è presente a livello di cuore, milza, polmone, fegato. Nell'adulto è stata isolata anche a livello di colon, prostata, mammella, cervello, retina e melanociti (Tello-Montoliu et al, 2006). Diversi studi hanno attribuito alle RNasi un potenziale effetto citotossico secondario alla loro capacità di idrolizzare gli acidi ribonucleici. Angiogenina ha una specificità per il tRNA determinandone l'idrolisi ed abolendo la traduzione della sequenza ribonucleotidica a livello dei ribosomi (Saxena et al, 1992).

Angiogenina è presente normalmente nella circolazione (Tello-Montoliu et al, 2006) ed è prodotta prevalentemente dal fegato (Yoshioka et al, 2006). Alcune condizioni fisiopatologiche determinano un incremento dei livelli plasmatici di Angiogenina come, per esempio, l'aumento dei livelli plasmatici degli acidi ribonucleici rilasciati durante l'attività fagocitica dei macrofagi o dalla necrosi cellulare. Angiogenina, inoltre, regola la neoangiogenesi sia in condizione fisiologiche che patologiche, ma con un'attività

decisamente inferiore rispetto a quella di altri fattori come VEGF (Kishimoto et al, 2005).

Esistono due tipi di recettori per Angiogenina sulle cellule endoteliali. Il primo è una molecola di peso molecolare pari a 42 kDa, presente sulla superficie della cellula endoteliale che si è scoperto essere l' $\alpha$ -Actina del tipo espresso nel muscolo liscio. Il secondo è una presunta proteina di 170 kDa localizzata sulla superficie della cellula endoteliale. Studi di immunofluorescenza hanno dimostrato che, in seguito al legame tra Angiogenina ed il recettore da 170 kDa, si ha l'endocitosi del complesso Angiogenina-recettore a cui segue una reazione a cascata mediata da proteasi cellulari (Hu et al, 1997; Katona et al, 2005; Tello-Montoliu et al, 2006). Il complesso viene quindi trasferito nel nucleo dove si accumula a livello del nucleolo e stimola la trascrizione di rRNA. Kishimoto e collaboratori nel 2005 hanno dimostrato che, quando la traslocazione nucleare è inibita, l'attività angiogenica viene abolita. L'attività di Angiogenina è fondamentale per la proliferazione della cellula endoteliale anche indotta da altri promotori come aFGF, bFGF e VEGF. (Chen et al, 2006) Il blocco della traslocazione nucleare dell'Angiogenina indotto da Neomicina, per esempio, è in grado di inibire l'angiogenesi indotta da bFGF o VEGF (Kishimoto et al, 2005).

I passaggi dell'azione dell'Angiogenina prevedono (Figura 4):

1. Danno tessutale con rilascio di  $\alpha$ -Actina ed RNA degenerato da cellule necrotiche e dalla matrice extracellulare, con promozione dell'espressione di Angiogenina.
2. Legame dell'Angiogenina con l' $\alpha$ -Actina di superficie e attivazione del sistema di proteasi con conseguente degradazione della matrice extracellulare e dissoluzione della membrana basale.

3. Espressione del recettore per l'Angiogenina da 170 kDa, internalizzazione del complesso e traslocazione nel nucleo, cui segue l'attivazione della trascrizione genica.
4. Maturazione della parete vascolare grazie alla migrazione e alla proliferazione delle cellule endoteliali e muscolari lisce, con riarrangiamento della parete vasale (Tello-Montoliu et al, 2006).

La regolazione delle cellule endoteliali è molto specifica e il blocco dell'attività di Angiogenina comporta un blocco del processo proliferativo tale che la cellula endoteliale non riuscirebbe a replicare neanche se esposta a potenti mitogeni (Kishimoto et al, 2005).

L'espressione di Angiogenina può essere up-regolata in risposta all'ipossia nel contesto del tumore, mediante la produzione di HIF-1 (Chen et al, 2006).

Il grande interesse verso Angiogenina è legato al fatto che appare direttamente coinvolta nella crescita del tumore primitivo e metastatico (Tello-Montoliu et al, 2006).

#### ***1.4 CD105 – ENDOGLINA***

CD105 (Endogлина) è una glicoproteina di membrana di 180 kDa composta da due subunità unite da ponti disolfuro. Nell'uomo il gene che codifica per CD105 è localizzato a livello del cromosoma 9q34 e è composto da 14 esoni. L'Endogлина è una proteina transmembrana (Figura 5) (Gougos e Letarte, 1990). CD105 fa parte del complesso recettoriale per il TGF- $\beta$  (Cheifetz et al, 1992) (Figura 6), una citochina pleiotropica che regola diverse funzioni cellulari tra cui la proliferazione, la differenziazione, la migrazione, la sintesi di matrice extracellulare, l'ematopoiesi ed infine l'angiogenesi. La presenza di un tripeptide Arginina-Glicina-Aspartato nel dominio extracellulare suggerisce la possibilità che Endogлина funga da ligando per le

integrine e ciò fa ipotizzare un suo possibile coinvolgimento anche nell'adesione cellulare (Fonsatti et al, 2001). Recentemente tale coinvolgimento è stato dimostrato nelle cellule prostatiche (Fonsatti et al, 2003).

L'espressione di CD105, così come quella di VEGF e Angiogenina, sembra essere indotte dall'ipossia caratteristica del tessuto neoplastico, fin dalle fasi precoci della crescita tumorale (Chien et al, 2008).

L'espressione di CD105 è stata studiata anche nei carcinomi squamosi di cavo orale, orofaringe (Schimming e Marmè, 2002; Shimming et al, 2004; Nagatsuka et al, 2005; 3.Marioni et al, 2006; 1.Chien et al, 2006; Chuang et al, 2006) e ipofaringe (2.Chien et al, 2006). Nell'ambito del carcinoma squamoso della testa e del collo, CD-105 sarebbe espressa quasi esclusivamente a livello delle cellule endoteliali dei vasi ematici sia peritumorali che intratumorali. (Fonsatti et al, 2003; 2.Marioni et al, 2005) Con tecniche di immunofluorescenza si è evidenziato che anticorpi monoclonali per CD105 coloravano le cellule endoteliali dei vasi con angiogenesi attiva propria delle neoplasie maligne, mentre non si riscontrava una colorazione significativa dei vasi ematici dei tessuti normali (4.Marioni et al, 2006). Recenti studi hanno dimostrato inoltre che l'iperespressione di CD105 nell'endotelio delle neoplasie maligne correla con la presenza di metastasi (Chien et al, 2006). L'affidabilità di CD105 nel quantificare la densità dei microvasi intratumorali, definita come densità microvascolare (MVD), è stata ormai convalidata. MVD è considerata un attendibile fattore prognostico nelle neoplasie maligne.

## ***1.5 IMPORTANZA DEI PRINCIPALI MARCATORI ANGIOGENICI***

### ***MVD***

La scoperta del ruolo fondamentale della neoangiogenesi nella progressione della patologia neoplastica ha dato vita ad una fervente ricerca in questo campo che ha portato allo studio di vari marcatori molecolari tra cui Angiogenina e CD105 (Fonsatti e Maio, 2004).

MVD viene definita come il valore medio del numero di vasi colorati e si ricava studiando più campi all'interno delle aree più vascolarizzate della neoplasia (hot spots). L'aumento di MVD è correlato ad una progressione veloce del tumore, ad una più breve sopravvivenza libera da malattia e quindi ad una più alta probabilità di recidiva tumorale. Per quanto riguarda il carcinoma squamoso della testa e collo, MVD determinata con l'uso di anticorpi anti-CD105 che, come già detto è abbondantemente espressa nelle cellule endoteliali angiogeniche e presenta un'elevata specificità per i vasi neoplastici (Tanaka et al, 2002), correla con una peggiore prognosi di malattia (Fonsatti et al, 2003; Martone et al, 2005; Kizas et al, 2006). MVD determinata mediante l'espressione di CD105, in particolare, è stata dimostrata essere significativamente più alta nei carcinomi con invasione a livello regionale (N+) e nei casi con sopravvivenza libera da malattia e sopravvivenza significativamente più basse.

CD105 sembra essere un marcatore più specifico rispetto agli altri markers tumorali panendoteliali come CD31, CD34, fattore VIII. L'elevata espressione di CD105 nei microvasi presenti nei campionamenti bioptici delle lesioni primitive del carcinoma squamoso del cavo orale, per esempio, correla significativamente con la presenza di malattia a livello linfonodale (Chien et al, 2006).

CD105 rappresenterebbe ottimo target vascolare in quanto espresso sul versante luminare della cellula endoteliale e quindi costantemente esposto al flusso ematico e pertanto facilmente accessibile (Fonsatti et al, 2001).

### ***Target therapy***

I recenti progressi in biologia molecolare, l'identificazione di recettori cellulari, enzimi e meccanismi coinvolti nella crescita neoplastica hanno spostato l'attenzione sulla ricerca per lo sviluppo di farmaci biologici mirati. Il loro utilizzo è in grado di colpire in maniera mirata le cellule neoplastiche o i meccanismi critici che permettono la crescita tumorale. Lo scopo della target therapy è quello di aumentare la percentuale di guarigione grazie all'aumento dell'efficacia dei trattamenti tradizionali senza aumentare in maniera significativa gli effetti collaterali dei comuni trattamenti antitumorali (Mierzwa et al, 2010). Per sviluppare una buona terapia mirata è necessario identificare dei bersagli noti per essere coinvolti nella crescita e nella sopravvivenza delle cellule neoplastiche. Vista l'importanza che riveste la perfusione ematica della massa tumorale per la progressione della malattia, la neoangiogenesi tumorale è uno dei più interessanti bersagli nel campo della terapia oncologica molecolare. Esistono due modalità di azione anti-neoplastica agendo a livello vascolare (Figura 7), mediante l'inibizione della neoangiogenesi tumorale (*terapia antiangiogenica*) o colpendo selettivamente i vasi neoplastici esistenti (*Vascular targeting therapy*). La *terapia antiangiogenica* è una delle più promettenti strategie terapeutiche molecolari in campo oncologico. I suoi vantaggi principali sono l'elevata specificità per le cellule endoteliali altamente proliferanti e la tossicità relativamente bassa. Gli agenti

antiangiogenetici ad oggi più studiati sono quelli anti-VEGF (Ferrara et al, 2002), ma studi molto recenti applicati su modelli animali hanno valutato l'efficacia degli anticorpi anti-CD105 (Dallas et al, 2008). Bevacizumab per esempio è un anticorpo in grado di complessarsi con VEGF. Altri agenti anti-angiogenetici sono gli inibitori delle metalloproteinasi, gli inibitori peptidici naturali come l'Endostatina e l'Angiostatina. (Eichhorn et al, 2004).

Gli studi pre-clinici finora disponibili evidenziano il fatto che non si sviluppano resistenze ai trattamenti antiangiogenetici in quanto le cellule endoteliali raramente sviluppano mutazioni in grado di conferire tale resistenza. Interessanti risultati di studi sperimentali hanno dimostrato che anticorpi monoclonali anti-CD105 possono legarsi all'endotelio dei vasi neoplastici riuscendo ad inibire l'angiogenesi, la crescita tumorale e la metastatizzazione (Fonsatti e Maio, 2004).

La *Vascular targeting therapy* è mirata verso antigeni vascolari ed ha lo scopo di provocare una rapida e selettiva riduzione dei vasi ematici neoplastici. A differenza della terapia antiangiogenetici che mira ad inibire la formazione di nuovi vasi, la "vascular targeting therapy" induce l'occlusione dei vasi neoplastici preesistenti determinando una estesa necrosi del tumore. Farmaci diretti contro gli antigeni vascolari potrebbero essere in grado di eliminare le cellule tumorali resistenti alle convenzionali terapie citotossiche antiproliferative. Esistono principalmente due tipi di farmaci con bersaglio vascolare: le molecole a basso peso molecolare e i ligandi recettoriali. Le prime includono farmaci destabilizzanti le microtubuline, come la Combretastatina A-4 disodio fosfato, le seconde sono anticorpi monoclonali che agiscono legandosi selettivamente ad antigeni vascolari tumorali veicolando agenti in grado di occludere il lume



vascolare. Tra gli agenti coniugabili agli anticorpi vi sono citochine come la Ricina A, proteine di fusione, fattori di crescita, molecole coinvolte nell'angiogenesi e nel rimodellamento vascolare, farmaci incapsulati all'interno di liposomi (Thorpe, 2004).

Vari studi condotti in vivo su cavie hanno dimostrato che l'utilizzo di anticorpi monoclonali anti-CD105 coniugati con tossine hanno un'elevata efficacia come agenti antineoplastici, verosimilmente mediata sia dall'inibizione dell'effetto pro-angiogenico che dalla distruzione della vascolatura tumorale (Fonsatti et al, 2001). Esprimendo i vasi dei tessuti non neoplastici bassi livelli di recettore, questi risultano resistenti all'azione di questi agenti (Thorpe, 2004).

## **2 SCOPO DELLO STUDIO**

Recenti studi in questo campo hanno dimostrato il ruolo di Maspina nucleare come importante oncosoppressore e come potente inibitore della neoangiogenesi. Uno studio pubblicato nel 2010 e condotto su pazienti affetti da carcinoma della laringe ha studiato l'espressione di Endogлина ed Angiogenina nelle cellule neoplastiche dimostrando che l'espressione di entrambe era correlata negativamente con la prognosi (Marioni et al, 2010).

Lo scopo del presente studio è quello di valutare l'espressione di Maspina, Endogлина e Angiogenina in una coorte di 104 pazienti consecutivi sottoposti a chirurgia per carcinoma della laringe. Si è voluto inoltre valutare la relazione tra l'espressione di queste molecole, potenziali bersagli terapeutici, e i più comuni parametri clinico-patologici e prognostici. Per ridurre la possibilità di rilevanti "bias" legati all'eterogeneità delle casistiche in un contesto retrospettivo, si è deciso di studiare solo materiale ottenuto da exeresi chirurgica, eseguita dalla stessa equipe, e non da biopsie.

### **3 MATERIALI E METODI**

#### ***Pazienti***

E' stata studiata una popolazione di 104 casi consecutivi di carcinoma squamoso della laringe (93 maschi e 11 femmine, età media di  $64.9 \pm 9$  anni). Tutti i pazienti sono stati valutati pre-operatoriamente mediante faringo-laringoendoscopia e sottoposti ad ecografia del collo, associata o meno a citologia, e microlaringoscopia con biopsia laringea. Si è quindi proceduto a studiare la malattia mediante indagini radiologiche (tomografia computerizzata con mezzo di contrasto, risonanza magnetica nucleare con gadolinio, radiografia del torace, ecografia epatica). Tutti i pazienti sono stati sottoposti a laringectomia parziale o totale, associata o meno a svuotamento laterocervicale monolaterale o bilaterale, presso la Clinica Otorinolaringoiatrica dell'Università di Padova. Venticinque pazienti sono stati trattati anche con radioterapia adiuvante.

In accordo con la classificazione TNM dei tumori maligni dell'International Union Against Cancer (2002) la stadiazione delle neoplasie laringee dei pazienti entrati nello studio è riportata in Tabella 3. Non sono state individuate metastasi a distanza in nessuno dei pazienti analizzati nello studio. La durata media del follow-up è stata di  $50.8 \pm 27.4$  mesi con una mediana di 44.5 mesi.

#### ***Preparazione del materiale***

Per la valutazione immunoistochimica tutti i pezzi operatori sono stati fissati in paraformaldeide al 4%, inclusi in paraffina e successivamente sezionati mediante microtomo in sezioni da 5  $\mu$ m di spessore.

### ***Immunoistochimica per Maspina***

Per lo studio immunoistochimico di Maspina, si è utilizzato l'anticorpo monoclonale murino MASPIN, clone G167-70 (BD-Biosciences, PharMingen Int, San Diego, CA, USA), diluito 1:500.

Inizialmente le sezioni sono state poste al microonde (750 W) per 20 minuti in un buffer citrato (10 mM pH 6.0) al fine di scoprire l'antigene. Le sezioni sono state poi incubate per 45 minuti in una stanza a temperatura ambiente con l'anticorpo primario. Quindi, le sezioni sono state incubate con EnvisionSystem HRP mouse (Dako, Denmark) per 30 minuti. Il colore è stato sviluppato utilizzando 3.3-diaminobenzidina (Dako, Denmark) per 4 minuti. Le sezioni sono state poi controcolorate con Mayer-ematossilina. Come controllo positivo si è utilizzato tessuto di mammella sano e come controllo negativo l'anticorpo è stato sostituito da soluzione tampone fosfata (PBS). Le sezioni sono state esaminate ad ingrandimento 100X al fine di selezionare, all'interno delle aree di minore differenziazione del tumore, le tre aree con il maggior grado di vascolarizzazione (Hot Spots), libere da necrosi e da emorragia.

### ***Immunoistochimica per Angiogenina***

La reattività dell'Angiogenina è stata valutata attraverso l'impiego di un anticorpo monoclonale murino, diluito 1:400 (clone MANG-1, AbDserotech, MorphoSys, Oxford, UK). La rilevazione immunistoichimica è stata eseguita utilizzando un sistema automatico (Bond-maX; Vision BioSystems, UK). Le sezioni tissutali sono state isolate dalla cera e successivamente reidratate mediante incubazione a 72°C in Bond Dewax Solution (Vision BioSystem UK), etanolo e acqua distillata. Le sezioni sono state pretrattate mediante proteinasi K per dieci minuti a 37°C. La perossidasi endogena è stata bloccata con perossido di idrogeno al 3% quindici minuti prima dell'incubazione con l'anticorpo primario. Le sezioni sono state poi lavate con soluzione tampone fosfato a pH 7.0 e incubate con Bond Polymer Define Detection Kit (Vision BioSystem UK). Le sezioni sono state quindi disidratate, schiarite e montate. Il colore è stato sviluppato usando 3,3'-diaminobenzidine (Vision BioSystem UK) per 4 minuti. Le sezioni sono state controcolorate con Meyer-Ematossilina.

Campioni di tonsilla e placenta umana sono stati utilizzati come controlli positivi e siero privo di anticorpo primario come controllo negativo. Così come per Maspina, l'espressione di Angiogenina è stata esaminata nelle medesime Hot Spot Areas sia nelle cellule di carcinoma che nei vasi tumorali. Nelle cellule di carcinoma l'espressione di Angiogenina è stata misurata come percentuale di cellule positive alla colorazione. Nei vasi tumorali l'espressione di Angiogenina è stata valutata in base ad un punteggio (Score) da 0 a 3. Il punteggio è stato attribuito secondo i criteri illustrati in Tabella 4.

### ***Immunoistochimica per CD105***

Le sezioni sono state pre-incubate con “protein block” (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle upon Tyne, UK) per 5 minuti e trattate con l’anticorpo monoclonale murino CD105 (clone SN6h) diluito 1:10 (DAKO, Glostrup, Denmark). Successivamente il materiale è stato lavato con soluzione tampone fosfato a pH 7.0 per 3 minuti e incubato con il blocco primario (Novolink Polimer Detection System, Novocastra) per 20 minuti. Il colore è stato sviluppato con 3.3’-diaminobenzidine (DAKO) per 4 minuti. Le sezioni sono state controcolorate con Meyer-Ematossilina. Come controllo positivo si è utilizzato un campione di angiosarcoma e come controllo negativo si è sostituito l’anticorpo con soluzione tampone fosfato. Il tracciante per CD105 citoplasmatico è stato quindi ricercato nelle cellule endoteliali di carcinoma a cellule squamose della laringe a livello delle stesse Hot Spot Areas.

### ***Analisi d’immagine***

Tutte le misure sulle aree Hot Spots sono state effettuate ad ingrandimento 400X da un sistema di analisi dell’immagine Workstation CYRES (Zeiss, Jena, Germany) costituito da un microscopio convenzionale (Axioscop, Zeiss, Jena, Germany) connesso ad una videocamera 3CCD color (KY-F55BE, JCV, Japan). Le immagini sono state raccolte da un rilevatore (Kontron, Eching, Germany) e quindi analizzate. Il rilevatore e il programma d’analisi dell’immagine, operante in linea con la videocamera, sono stati collegati ad un personal computer. Durante tutta la sessione di misura l’illuminazione è stata mantenuta ad un valore fisso costante e l’effetto di dispersione della luce è stato ridotto impostando l’illuminazione secondo Koehler. La segmentazione in linea e la misurazione di

routine hanno permesso di evitare gli artefatti e di controllare tutte le aree selezionate dopo le misurazioni. E' stata inoltre effettuata una calibrazione spaziale da un micrometro di fase. Il valore ottenuto è stato 0,25 micron/pixel, in accordo con la teoria di campionamento di Shannon-Nynquist. Tutti i valori misurati erano compresi nel range tra 60 e 117 della scala di grigi per CD105 e tra il 10 e 90 per Maspina. Per ogni campione è stata determinata la percentuale di campi occupati dai microvasi marcati con CD105.

Per l'analisi della reattività di Maspina, è stato eseguito un doppio conteggio, il primo per valutare la percentuale di nuclei colorati (minimo di 600 cellule a x400) ed il secondo per la valutazione del pattern di distribuzione di Maspina a livello sub-cellulare creando due categorie: nucleare (> 5% nuclei positivi; reattività citoplasmatica quasi completamente assente) e non nucleare (positività citoplasmatica > 5% delle cellule contate e reattività nucleare quasi assente).

### *Analisi statistica*

Sono stati eseguiti i seguenti test statistici: Fisher's exact test, Mann-Whitney U test e Spearman's rank correlation. Il Log-rank test e il modello di regressione di Cox sono stati impiegati per mostrare e confrontare le differenti sopravvivenze libere da malattia dei pazienti stratificati, in accordo alle variabili selezionate ed ai rischi associati. La curva ROC (Receiver operating curve) è stata utilizzata per determinare il valore di cut-off di CD105 che meglio si adattava all'analisi di sopravvivenza. E 'stato considerato come significativo un valore di  $p < 0.05$ . I valori di  $p$  compresi tra 0.05 e 0.10 sono stati considerati come indicativi di un trend statisticamente significativo. Il

software statistico utilizzato è stato STATA 8 (Stata Corp, College Station, TX, USA).



## 4 RISULTATI

### *Outcome clinico e Follow-up*

In 73 dei 104 casi di carcinoma squamoso della laringe non si è verificata recidiva di malattia dopo il trattamento. Trentuno pazienti hanno sviluppato recidiva locoregionale dopo un periodo medio di  $21.8 \pm 26.5$  mesi (mediana 14 mesi). Il follow-up medio è stato di  $53.1 \pm 27.0$  mesi nei pazienti che non hanno sviluppato recidiva e di  $45.6 \pm 27.8$  mesi nei pazienti con recidiva di malattia ( $p=0.19$ ).

### *Parametri clinico-patologici e prognosi*

Si è rilevata una correlazione staticamente significativa tra pT ( $p=0.042$ ), il coinvolgimento linfonodale (N0/N+) ( $p=0.002$ ), lo stadio clinico ( $p=0.002$ ) e l'insorgenza di recidiva locoregionale; al contrario il grading non si è dimostrato correlare con l'insorgenza di recidiva ( $p=0.52$ ).

Il log-rank test ha mostrato una sopravvivenza libera da malattia significativamente diversa nei pazienti stratificati secondo l'N ( $p=0.0001$ ), lo stadio clinico ( $p=0.0001$ ) e il grading isto-patologico ( $p=0.023$ ). In particolare, il mancato coinvolgimento linfonodale, uno stadio clinico meno avanzato ed una maggiore differenziazione isto-patologica correlavano con tempi liberi da malattia più lunghi. Anche la dimensione del tumore primitivo (pT) ha mostrato una correlazione con la sopravvivenza libera da malattia, evidenziando all'analisi statistica un trend di significatività ( $p=0.051$ ).

Infine, i pazienti sottoposti a RT adiuvante hanno mostrato un sopravvivenza libera da malattia significativamente più breve e un tasso di recidiva loco-regionale maggiore ( $p=0.007$  e  $p=0.027$ , rispettivamente).

### ***Pattern di espressione di Maspina (nucleare-non nucleare) e parametri clinico-patologici***

La localizzazione di Maspina a livello nucleare è stata riscontrata in 33 dei 104 casi, con una espressione media del 9.54% (SD 19,7%). Si è rilevata una correlazione significativa tra il pattern di espressione di Maspina e stadio clinico della malattia ( $p=0.022$ ). In particolare, un pattern nucleare di Maspina correlava con uno stadio clinico meno avanzato (Figura 8a e 8b).

### ***Pattern di espressione di Maspina e fattori prognostici***

Il pattern di espressione di Maspina ha correlato con fattori prognostici come la recidiva di malattia e la sopravvivenza libera da malattia ( $p=0.007$  e  $p=0.018$ , rispettivamente). In particolare, un pattern di localizzazione nucleare di Maspina correlava con minore probabilità di recidiva loco-regionale e più lunga sopravvivenza libera da malattia (Grafico 1).

### ***Espressione di Maspina nucleare e parametri clinico-patologici***

L'espressione percentuale di Maspina nucleare ha correlato significativamente con lo stato linfonodale ed il tasso di recidiva di malattia ( $p=0.013$ ;  $p=0.03$ ). Maggiore la percentuale nucleare di Maspina e minore lo stato patologico linfonodale e la probabilità di ripresa di malattia loco-regionale (Tabella 5). Si è inoltre trovato un trend statisticamente significativo tra la percentuale di espressione nucleare di Maspina ed la sopravvivenza libera da malattia ( $p=0.063$ ).

***Relazione tra percentuale d'espressione di Angiogenina nelle cellule di carcinoma ed espressione di Angiogenina nelle cellule endoteliali dei vasi neoplastici e parametri clinico-patologici e prognostici***

La colorazione di Angiogenina è risultata essere presente in 63 dei 104 campioni di carcinoma a cellule squamose (60,6%). La membrana e il citoplasma delle cellule neoplastiche hanno mostrato un'evidente colorazione, con una percentuale di cellule tumorali positive compresa tra lo 0% ed il 100% e con intensità di colorazione variabile (Figura 9). L'espressione media di Angiogenina nelle cellule di carcinoma laringeo è stata del  $21.2\% \pm 31.4\%$ . La Tabella 6 mostra l'associazione tra lo score di Angiogenina nelle cellule endoteliali dei vasi neoplastici e l'espressione di Angiogenina nelle cellule di carcinoma squamoso della laringe.

L'analisi statistica ha mostrato non esistere una correlazione significativa dei parametri clinico-patologici della neoplasia né con la percentuale d'espressione di Angiogenina nelle cellule del carcinoma laringeo né con l'espressione di Angiogenina nelle cellule endoteliali della neoplasia (Tabella 6). L'espressione endoteliale di Angiogenina ha mostrato invece un trend statisticamente significativo se correlata con la recidiva di malattia ( $p=0.09$ ).

***Relazione tra l'espressione di CD105 e i parametri clinico-patologici e prognostici***

L'espressione di CD105 è particolarmente evidente nei vasi intratumorali, mentre è sostanzialmente assente nelle cellule di carcinoma squamoso della laringe e nelle componenti stromali del tumore (Figura 10). Tale espressione non si è mostrata correlare significativamente con i parametri clinico-patologici (Tabella 7), mentre ha correlato significativamente con la recidiva di malattia

( $p=0.0031$ ), in particolare maggiore l'espressione di CD105 e maggiore la probabilità di recidiva loco-regionale (Tabella 8). Si è utilizzata la curva ROC per determinare il valore di cut-off di CD105 che meglio si adattava all'analisi di sopravvivenza. Tale valore è risultato pari al 5.8%. L'analisi statistica ha rilevato che la sopravvivenza libera da malattia era significativamente minore nei casi con espressione di CD105 maggiore del 5.8% rispetto a quelli con espressione di CD105 minore del 5.8% ( $p=0.0022$ ) (Grafico 2).

***Relazione tra il pattern d'espressione di Maspina, la percentuale di espressione nucleare Maspina e l'espressione di CD105 ed Angiogenina***

Non vi è stata correlazione statistica significativa tra la percentuale d'espressione nucleare di Maspina o il pattern di Maspina e l'espressione di CD105 nei casi presi in esame in questo studio (Tabella 7 e Tabella 9). Così come per CD105, anche la percentuale d'espressione di Angiogenina nelle cellule di carcinoma e l'espressione di Angiogenina nelle cellule endoteliali dei vasi neoplastici non hanno mostrato correlazione statistica né con il pattern d'espressione di Maspina né con l'espressione nucleare di Maspina (Tabella 7).

***Relazione tra l'espressione di Angiogenina e quella di CD105***

Si è verificata una correlazione statisticamente significativa tra l'espressione di CD105 e la percentuale d'espressione di Angiogenina nelle cellule carcinomatose ( $p=0.037$ ). L'espressione endoteliale di Angiogenina ha mostrato invece un trend di significativa correlazione con l'espressione di CD105 ( $p=0.092$ ).

Infine, è stata individuata una correlazione tra lo score di Angiogenina nelle cellule endoteliali e la percentuale d'espressione di Angiogenina nelle cellule di carcinoma ( $p=0.001$ ) (Tabella 7).

### ***Analisi della sottopopolazione di pazienti studiati senza invasione linfonodale (N0)***

Valutando il sottogruppo di pazienti esenti da malattia a livello linfonodale latero-cervicale (N0) al momento della diagnosi, l'analisi statistica ha mostrato che il pattern d'espressione di Maspina e la percentuale di Maspina nucleare correlavano significativamente con la recidiva locoregionale di carcinoma ( $p=0.0039$  e  $p=0.038$ , rispettivamente). In particolare, maggiore risultava la percentuale di espressione di Maspina nucleare e minore era la probabilità di sviluppare recidiva loco-regionale. Il pattern di espressione di Maspina correlava inoltre con la sopravvivenza libera da malattia ( $p=0.047$ ), in particolare i pazienti con un pattern nucleare hanno evidenziato sopravvivenze libere da malattia significativamente più lunghe (Grafico 3).

L'espressione di CD105 correlava inversamente con la sopravvivenza libera da malattia in mesi ( $p=0.05$ ) e direttamente con il tasso di recidiva loco-regionale ( $p=0.01$ ). In particolare, nei pazienti con maggiore espressione di CD105 ( $>5.8\%$ ) si aveva minore sopravvivenza libera da malattia e maggiore probabilità di recidiva loco-regionale (Grafico 4).

La percentuale d'espressione di Angiogenina nelle cellule carcinomatose ha mostrato un trend di correlazione statisticamente significativo con la sopravvivenza libera da malattia, ovvero nei pazienti con maggiore percentuale d'espressione di Angiogenina si assisteva ad una sopravvivenza libera da malattia più breve ( $p=0.07$ ).

L'espressione endoteliale di Angiogenina ha dimostrato un trend di correlazione con la sopravvivenza libera da malattia e con il tasso di recidiva loco-regionale ( $p=0.06$  e  $p=0.09$ , rispettivamente). In particolare, nei pazienti con maggiore espressione endoteliale di Angiogenina si evidenziava una più breve sopravvivenza ed una maggiore probabilità di recidiva loco-regionale.

Le correlazioni statisticamente non significative tra i marcatori biologici e i parametri clinico-patologici e prognostici nella popolazione N0 sono mostrati in Tabella 10.

## 5 DISCUSSIONE

L'angiogenesi è essenziale per la crescita neoplastica maligna. Alla base di questo processo vi è uno sbilanciamento tra i fattori pro-angiogenici e quelli anti-angiogenici, prodotti sia dalle cellule neoplastiche che da quelle normali. Vari studi condotti finora hanno mostrato una stretta relazione tra MVD ed invasività neoplastica sia a livello locale che a distanza. Una maggiore invasività neoplastica correla con una prognosi peggiore (Li et al, 2005). E' quindi evidente l'importanza che riveste la ricerca scientifica nel campo dei marcatori angiogenici al fine di utilizzarli come fattori prognostici, come indicatori dell'efficacia del trattamento in atto e come eventuali bersagli terapeutici (target therapy).

E' stato dimostrato che Maspina, sia in vivo che in vitro, si comporta come un potente inibitore della neoangiogenesi. Nel 2002 Song et al. hanno dimostrato che nel cancro del colon l'espressione di Maspina era inversamente correlata con la MVD studiata mediante CD34. Due anni dopo, Wang e colleghi (2004) hanno riportato un risultato sovrapponibile nel carcinoma gastrico. In entrambi gli studi, l'immunoreattività della Maspina era prevalentemente localizzata a livello citoplasmatico. Sopol e colleghi nel 2005, studiando pazienti affetti da tumore invasivo duttale mammario, hanno anche loro dimostrato un decremento significativo della MVD associato ad un incremento dell'espressione di Maspina. Solomon e colleghi, in uno studio pubblicato nel 2006, hanno concluso che l'espressione di Maspina nucleare era associata ad una significativa riduzione di MVD studiata mediante CD34 nel carcinoma epiteliale ovario.

Il ruolo della Maspina nel carcinoma a cellule squamose della laringe è stato studiato per la prima volta da Marioni e collaboratori nel 2005

(1.Marioni et al, 2005) dimostrando, nei 35 casi consecutivi presi in esame, un'espressione di Maspina nucleare significativamente maggiore nei pazienti senza recidiva neoplastica. La localizzazione nucleare di Maspina era inoltre significativamente associata ad una più lunga sopravvivenza libera da malattia. Gli Autori concludevano che la localizzazione nucleare della Maspina gioca molto probabilmente un ruolo nella diminuzione dell'aggressività neoplastica. Maspina è, inoltre, coinvolta nell'apoptosi delle cellule tumorali, come dimostrato dal fatto che in un recente studio Maspina nucleare è stata dimostrata correlare significativamente nel carcinoma laringeo con l'espressione di M30, anticorpo monoclonale murino diretto contro un neoepitopo posto sulla citocheratina 18 che è presente nel citoplasma delle cellule epiteliali tumorali nelle fasi iniziali dell'apoptosi (1.Marioni et al, 2008). Questo studio inoltre confermava che la localizzazione nucleare di Maspina si associava sia ad una diminuzione del tasso di recidiva che ad un significativo aumento della sopravvivenza libera da malattia. Come nel carcinoma ovarico, anche nel carcinoma della laringe l'espressione nucleare di Maspina appare associata in maniera inversa alla neoangiogenesi neoplastica (2.Marioni et al, 2006): MVD, studiata attraverso l'espressione di CD105, era significativamente minore nei carcinomi laringei con una localizzazione nucleare di Maspina, rispetto a quelli con prevalente localizzazione citoplasmatica.

CD105, glicoproteina di membrana particolarmente espressa nelle cellule endoteliali proliferanti e in particolar modo a livello delle cellule endoteliali dei vasi ematici sia peritumorali che intratumorali, è stata dimostrata correlare con con la presenza di metastasi. Inoltre, vari studi in letteratura confermano l'affidabilità di CD105 nel quantificare la MVD intratumorale, considerata uno tra i più



attendibili fattori prognostici delle neoplasie maligne. Lo studio della MVD mediante identificazione di CD105 con anticorpi monoclonali ha dimostrato che MVD può essere considerato un fattore prognostico in diverse neoplasie maligne solide (Chien et al, 2006). L'espressione di CD105 nei tessuti neoplastici, infatti, è significativamente maggiore rispetto a quella dei tessuti sani e l'aumento di CD105, anche a livello del tessuto sano peritumorale, è stata associata ad una minore sopravvivenza libera da malattia e ad una minore sopravvivenza generale (Bellone et al, 2007). A livello della testa e del collo, l'espressione di CD105 è risultata aumentata nei carcinomi squamosi del cavo orale in confronto alla mucosa orale sana (Schimming e Marmè, 2002). Nel carcinoma del cavo orale e dell'orofaringe, l'espressione di CD105 è associata ad una peggiore prognosi (3.Marioni et al, 2006). La casistica più ampia di casi di carcinomi squamosi della testa e del collo studiata con CD105 è quella di Martone e collaboratori (2005) che hanno osservato che MVD, rilevata mediante colorazione per CD105, è significativamente maggiore nei tumori che hanno dato metastasi a livello locoregionale. Studi sulla laringe sono stati condotti e pubblicati nel 2006 da Marioni e collaboratori che hanno riscontrato un'associazione statisticamente significativa tra l'espressione di CD105 e la recidiva di malattia a livello locoregionale (4.Marioni et al, 2006). Confrontando inoltre l'espressione di CD105 nel tessuto sano e in quello neoplastico, gli Autori dimostravano che solo rari vasi presenti nella mucosa sana adiacente al tumore presentavano una reazione per il CD105, così come, all'interno della neoplasia, le cellule non endoteliali del carcinoma e quelle nello stroma presentavano un'espressione quasi assente di CD105, confermando l'elevata specificità per l'endotelio neoplastico di questo marcatore.

Nel 2008, Marioni e coautori hanno valutato l'espressione e il ruolo di CD105 e del recettore per il fattore di crescita per l'endotelio vascolare (VEGFR2 o Flk/Kdr) nel carcinoma laringeo. L'analisi dei dati ha, ancora una volta, dimostrato un tasso di recidiva locoregionale significativamente più alto ed una sopravvivenza libera da malattia più breve nei pazienti con elevata espressione di CD105 (2. Marioni et al, 2008).

Angiogenina è un marcatore neoplastico legato alla crescita tumorale, alla progressione di malattia e all'aggressività della malattia. Appare particolarmente espressa nel contesto dei tumori solidi e pazienti con maggiori livelli di Angiogenina tendono a presentare una prognosi peggiore (Tello-Montoliu et al, 2006). L'espressione di Angiogenina è individuabile in carcinomi di varie sedi, dalla mammella al colon retto (Yoshioka et al., 2006). Nella maggior parte di tali carcinomi la prognosi è correlata con il grado di espressione di Angiogenina (Katona et al., 2005). Nell'ambito del carcinoma a cellule squamose della testa e collo, Marioni e collaboratori (2010) hanno recentemente pubblicato uno studio condotto sull'espressione di Angiogenina e di CD105 ed il loro ruolo biologico nel carcinoma squamoso della laringe. Gli Autori hanno riscontrato che l'espressione di Angiogenina correlava significativamente con la recidiva di malattia, essendo maggiormente espressa nei campioni di carcinoma provenienti dai pazienti che in seguito hanno sviluppato recidiva di malattia rispetto a coloro nei quali la malattia non è recidivata. Inoltre, un'elevata espressione di Angiogenina correlava inversamente con la sopravvivenza libera da malattia. Considerando la stessa coorte di carcinomi a cellule squamose di laringe, anche l'espressione di CD105 correlava intensamente con la sopravvivenza libera da malattia.

Essendo Maspina nucleare un potente inibitore della neoangiogenesi ed essendo Angiogenina e CD105 strettamente associate ai meccanismi di angiogenesi, nel presente studio abbiamo voluto valutare l'eventuale relazione esistente nell'espressione di questi tre marcatori nel carcinoma della laringe. Marioni e collaboratori nel 2006, studiando 35 casi di carcinoma della laringe, avevano dimostrato che non vi era una significativa correlazione inversa tra l'espressione di Maspina nucleare e MVD associata a CD105 (2.Marioni et al, 2006). Gli Autori concludevano che tale discrepanza fosse probabilmente dovuta al numero limitato di pazienti presi in esame. La presente ricerca, pur condotta su un campione di carcinomi della laringe ben più numeroso, conferma l'assenza di questa correlazione inversa, dimostrando che Maspina, che svolge molte funzioni oncosoppressive (neoangiogenesi, anti-apoptosi, etc...) determina l'inibizione della neoangiogenesi tumorale nel carcinoma laringeo probabilmente mediante meccanismi molecolari differenti ad oggi ancora sconosciuti.

In questa ricerca CD105 ed Angiogenina risultano essere fortemente correlati tra loro ed associati alla prognosi della malattia. Questi marcatori, alla luce dei risultati ottenuti, possono essere considerati validi parametri per individuare i pazienti con peggiore prognosi e quindi con maggiore rischio di recidiva loco-regionale. In particolare, potrebbero essere ritenuti molto utili nei pazienti clinicamente N0 per individuare la parte di questi a maggior rischio di malattia latero-cervicale. Nell'eventualità di elevate espressioni di Angiogenina e CD105, all'esame istologico della biopsia e del pezzo operatorio, il paziente andrebbe considerato ad alto rischio di recidiva e quindi potrebbe essere candidato ad una terapia più aggressiva e/o a un follow-up più stretto.

Le recenti evoluzioni in terapia molecolare, che hanno permesso l'identificazione di recettori cellulari, di enzimi e di meccanismi coinvolti nella crescita neoplastica e nell'immortalità cellulare, hanno aperto la strada allo sviluppo di farmaci biologicamente mirati dando vita a quella che viene comunemente definita come target therapy (Mierzwa, 2010). Questo studio evidenzia che il pattern di espressione nucleare di Maspina correla con minore probabilità di recidiva locoregionale. Inoltre la percentuale di espressione nucleare di Maspina presenta un trend di correlazione statisticamente significativo con la sopravvivenza libera da malattia. Recentemente, Beltran e collaboratori (2007) hanno dimostrato che un fattore di trascrizione artificiale (FTA) era capace di riattivare Maspina in linee cellulari che comprendevano un promotore della Maspina silente per meccanismi epigenetici. Tali autori hanno riportato che FTA può essere un potente induttore dell'apoptosi capace di abbattere l'invasione delle cellule tumorali della mammella in vitro.

Angiogenina e CD105, essendo coinvolti nella crescita neoplastica, potrebbero inoltre essere utili come bersagli di una terapia antiangiogenica mirata. L'inibizione o il blocco dell'espressione di Angiogenina, per esempio, potrebbe non solo ridurre l'attività neoangiogenica del tumore, ma anche inibire direttamente la proliferazione neoplastica, essendo Angiogenina coinvolta nella regolazione dell'angiogenesi, ma anche della proliferazione delle cellule neoplastiche (Tello-Montoliu et al, 2006).

Studi sperimentali hanno dimostrato che anticorpi monoclonali anti-CD105, non solo presentavano un'alta specificità per l'endotelio dei vasi intratumorali, ma erano efficaci nell'inibire l'angiogenesi, la crescita tumorale e lo sviluppo di metastasi nei modelli animali (Hofmeister et al, 2008; Fonsatti et al, 2004) . Questi risultati mettono

in luce CD105 come eccellente bersaglio vascolare per la target therapy. Uno studio sperimentale pubblicato nel 2006, ha in tal senso dimostrato che anticorpi chimerici (umani/murini) diretti contro CD105 hanno presentato in primati non umani dati di farmacocinetica e valori di tossicità incoraggianti, aprendo la strada a studi clinici di fase I (Shiozaky et al, 2006). Inoltre, è stato dimostrato che nel modello neoplastico murino, l'immunizzazione con CD105 ha indotto la produzione di anticorpi specifici anti-CD105 capaci di inibire l'angiogenesi e incrementare l'apoptosi nei tumori successivamente indotti successivamente (1.Tan et al, 2004; 2.Tan et al, 2004). Ulteriori studi attentamente progettati, coinvolgenti pazienti suscettibili all'inibizione di CD105 o di Angiogenina, potranno dimostrare l'efficacia di un trattamento combinato, nel quale associare le tradizionali strategie terapeutiche antitumorali alla target therapy contro antigeni vascolari.

## 6 CONCLUSIONI

In questo studio la localizzazione nucleare di Maspina nel carcinoma squamoso della laringe risulta correlata ad una migliore prognosi in termini di tasso di recidiva loco-regionale e di sopravvivenza libera da malattia.

CD105, marcatore che si è rivelato estremamente selettivo per i vasi neoformati nel contesto del carcinoma laringeo, appare nella sua espressione direttamente correlato al tasso di recidiva e, per espressioni superiori a 5.8%, associato ad una più breve sopravvivenza libera da malattia.

La localizzazione nucleare di Maspina e l'espressione di CD105 risultano avere importanti potenzialità in ambito diagnostico concorrendo all'individuazione precoce dell'evoluzione e della prognosi del carcinoma laringeo. Deve essere inoltre evidenziato come entrambe le proteine, sia pur con modalità molto differenti, debbano essere indagate come potenziali bersagli per approcci di target therapy nel trattamento del carcinoma laringeo.

## **BIBLIOGRAFIA**

- American Joint Committee on Cancer (AJCC). Cancer Staging Manual. Staging Forms. 6th ed. New York: 2002
- Bailey CM, Khalkhali-Ellis Z, Seftor EA, Hendrix MJ. Biological functions of maspin. *J Cell Physiol* 2006;209:617-624
- Bass R, Fernández AM, Ellis V. Maspin inhibits cell migration in the absence of protease inhibitory activity. *J Biol Chem.* 2002;277:46845-46848
- Bellone G, Solerio D, Chiusa L, Brondino G, Carbone A, Prati A, Scirelli T, Camandona M, Palestro G, Dei Poli M. Transforming Growth Factor- $\beta$  binding receptor Endoglin (CD105) expression in esophageal cancer and in adjacent nontumorous esophagus as prognostic predictor of recurrence. *Annals of Surgical Oncology* 2007;14:3232–3242
- Beltran A, Parikh S, Liu Y, Cuevas BD, Johnson GL, Futscher BW, Blancafort P. Re-activation of a dormant tumor suppressor gene maspin by designed transcription factors. *Oncogene* 2007;26:2791-2798
- Calgaro N, Marioni G, Blandamura S, Giacomelli L, Stramare R, Bertolin A, Staffieri A, de Filippis C. P27 and MIB-1 expression is related to malignancy recurrence in laryngeal carcinoma treated with partial laryngectomy: preliminary results. *J Otolaryngol.* 2007;36:98-105

- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other Diseases. *Nature* 2000;47:249-257
- Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letartell M. Endoglin is a component of the Transforming Growth Factor- $\beta$  receptor system in human endothelial cell. *The Journal of Biological Chemistry* 1992;267:19027-19030
- Chen Y, Zhang S, Chen YP, Lin JY. Increased expression of angiogenin in gastric carcinoma in correlation with tumor angiogenesis and proliferation. *World J Gastroenterol* 2006;12:5135-5139
- Cheng J, Slavin RE, Gallagher JA, Zhu G, Biehl TR, Swanstrom LL, Hansen PD. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and receptor flk-1 in colon cancer liver metastases. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2004;11:164–170
- 1. Chien CY, Su CY, Hwang CF, Chuang HC, Chen, CM, Huang CC. High expressions of CD105 and VEGF in early oral cancer predict potential cervical metastasis. *Journal Surgical Oncology* 2006;94:413–417
- 2. Chien CY, Su CY, Hwang CF, Chuang HC, Hsiao YC, Wu SL, Huang CC. Clinicopathologic significance of CD105 expression in squamous cell carcinoma of the ipopharynx. *Head Neck* 2006;28:441-446



- Chien CY, Su CY, Chuang HC, Fang FM, Huang HY, Chen CM, Chen CH, Huang CC. Clinical significance of Osteopontin expression in T1 and T2 tongue. *Head Neck* 2008;30:776-781
- Chuang HC, Su CY, Huang HY, Chien CY, Chen CM, Huang CC. High expression of CD105 as a prognostic predictor of early tongue cancer. *Laryngoscope* 2006; 116:1175–1179
- Dales JP, Garcia S, Carpentier S, Andrac L, Ramuz O, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Taranger-Charpin C. Prediction of metastasis risk (11 year follow-up) using VEGF-R1, VEGF-R2, Tie-2/Tek and CD105 expression in breast cancer (n=905). *Br J Cancer* 2004;22:1216-1221
- Dallas NA, Samuel S, Xia L, Fan F, Gray MJ, Lim SJ, Ellis LM. Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clinical Cancer Research* 2008;14:1931-1937
- Desai SB, Libutti SK. Tumor angiogenesis and endothelial cell modulatory factors. *Journal of Immunotherapy* 1999;22:186-211
- Dworak HF. Tumors: wounds that do not heal. *The New England Journal of Medicine* 1986;315:1650-1659
- Eichhorn ME, Strieth S, Dellian M. Anti-vascular tumor therapy: recent advances, pitfalls and clinical perspectives. *Drug Resist Update* 2004;7:125-138

- Farrag TY, Lin FR, Cummings CW, Koch WM, Flint PW, Califano JA, Broussard J, Bajaj G, Tufano RP. Neck management in patients undergoing postradiotherapy salvage laryngeal surgery for recurrent/persistent laryngeal cancer. *Laryngoscope* 2006;119:1864-1866
- 1. Ferlito A, Bailey BG. Squamous cell carcinoma. In: Ferlito, eds. *Neoplasms of the Larynx*. First Edition. New York NY: Churchill Livingstone 1993;113-133
- 2. Ferlito A, Bailey BG. Prognostic Factors. In: Ferlito A, eds. *Neoplasms of the Larynx*. First Edition. New York NY: Churchill Livingstone 1993;583-590
- Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 2002;29:10-14
- Fidler IJ, Yano S, Zhang RD, Fujimaki T, Bucana CD. The seed and soil hypothesis: vascularisation and brain metastases. *Lancet Oncol* 2002;3:53-57
- Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Cancer Biology* 1992;3:65-71.

- Fonsatti E, Del Vecchio L, Altomonte M, Sigalotti L, Nicotra MR, Coral S, Natali P, Maio M. Endoglin: an accessory component of the TGF- $\beta$ -Binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *Journal of Cellular Physiology* 2001;188:1-7
- Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor – associated angiogenetic blood vessels. *Oncogene* 2003;22:6557–6563
- Fonsatti E, Maio M. Highlights on Endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *Journal of Translational Medicine* 2004;2:18
- Forastiere A , Trotti A, Pfister DG, Grandis JR. Head and neck cancer: recent advances and new standards of care. *Journal of Clinical Oncology* 2006;24:2603-2605
- Fracchiolla NS, Pruneri G, Pignataro L, Carboni N, Capaccio P, Boletini A, Buffa R, Neri A. Molecular and immunohistochemical analisys of the bcl-1/cyclin D1 gene in laryngeal squamous cell carcinomas. *Cancer* 1997;79:1114-1121
- Gao X, Xu Z. Mechanisms of action of Angiogenin. *Acta Biochim Biophys Sin* 2008;40:619-624

- Gougos A, Letarte M: Biochemical characterization of the 44G4 antigen from the HOON pre-B leukemic cell line. *J Immunol* 1988;141:1934–1940
- Golusinski W, Olofsson J, Szmeja Z, Biczysko W, Krygier-Stojalowska A, Kulczinski B. A comprehensive analysis of selected diagnostic methods with respect to their usefulness in evaluating the biology of neoplastic cells in patients with laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1999;256:306-311
- Hanahan D, Weinberg RA: The Hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70
- Hobson B, Denekamp J. Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br J Cancer* 1984;49:405-413
- Hofmeister V, Schrama D, Becker JC. Anti-cancer therapies targeting the tumor stroma. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57:1-17
- Hu GF, Riordan JF, Vallee BL. A putative Angiogenin receptor in Angiogenin-responsive human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;18:2204-2209

- Katona K, Neubauer BL, Iversen PW, Zhang S, Baldrige LA, Cheng L. Elevated expression of Angiogenin in prostate cancer and its precursors. *Clinical Cancer Research* 2005;11:8358-8363
- Kim DH, Yoon DS, Dooley WC, Nam ES, Ryu JW, Jung KC, Park HR, Sohn JH, Shin HS, Park YE. Association of maspin expression with the high histological grade and lymphocyte-rich stroma in early-stage breast cancer. *Histopathology* 2003;42:37-42
- Kishimoto K, Liu S, Tsuji T, Olson KA, Hu G. Endogenous Angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene* 2005;24:445–456
- Kizas PA, Agnantis NJ, Stefanou D. Endoglin (CD105) as a prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2006;448:768–775
- Klohs WD, Hamby JM. Antiangiogenic agents. *Current Opinion in Biotechnology* 1999;10:544-549
- Laccourreya O, Diaz EM, Bassot V, Muscatello L, Garcia Brasnu D. A multimodal strategy for the treatment of patients with T2 invasive squamous cell carcinoma of the glottis. *Cancer* 1999;85:40-46

- Leon X, Quer M, Orus C, Lopez M, Gras JR, Vega M. Result of salvage surgery for local or regional recurrence after larynx preservation with induction chemotherapy and radiotherapy. *Head Neck* 2001;23:733–738
  
- Li C, Guo B, Wilson PB, Stewart A, Byrne G, Bundred N, Kumar S. Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int J Cancer* 2000;89:122–126
  
- Licitra L, Grandi C, Guzzo M, Mariani L, Lo Vullo S, Valvo F, Quattrone P, Valagussa P, Bonadonna G, Molinari R, Cantu G. Primary chemotherapy in resectable oral cavity squamous cell cancer: a randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 2003;21:327-333
  
- Lockett J, Yin S, Li X, Meng Y, Sheng S. Tumor suppressive maspin and epithelial homeostasis. *J Cell Biochem.* 2006;97:651-660
  
- 1. Marioni G, Blandamura S, Giacomelli L, Calgaro N, Segato P, Leo G, Fischetto D, Staffieri A. Nuclear expression of Maspin is associated with a lower recurrence rate and a longer disease free interval after surgery for squamous cell carcinoma of the larynx. *Histopathology* 2005;46:576-582
  
- 2. Marioni G, Gaio E, Giacomelli L, Marchese-Ragona R, Staffieri C, Staffieri A. Endoglin (CD105) expression in basaloid squamous cell carcinoma of head and neck. *Acta Otolaryngol* 2005;125:307-311

- 1. Marioni G, Marchese-Ragona R, Cartei G, Marchese F, Staffieri A. Current opinion in diagnosis and treatment of laryngeal carcinoma. *Cancer Treatment Reviews* 2006;32:504-515
  
- 2. Marioni G, D'Alessandro E, Giacomelli L, de Filippis C, Calgaro N, sari M, Staffieri A, Blandamura S. Maspin nuclear localisation is related to reduced density of tumor-associated microvessels in laryngeal carcinoma. *Anticancer Research* 2006;26:4927-4932
  
- 3. Marioni G, Marino F, Giacomelli L, Staffieri C, Mariuzzi ML, Violino, E, De Filippis C. Endoglin expression is associated with poor oncological outcome in oral and oropharyngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2006;126:633- 639
  
- 4. Marioni G, Ottaviano G, Giacomelli L, Staffieri C, Casarotti-Todeschini S, Bonandini E, Staffieri A, Blandamura S. CD105-assessed micro-vessel density is associated with malignancy recurrence in laryngeal squamous cell carcinoma. *EJSO* 2006;32: 1149-1153
  
- 1. Marioni G, Giacomelli L, D'Alessandro E, Marchese-Ragona R, Staffieri C, Ferraro SM, Staffieri A, Blandamura S. Nuclear localization of mammary serine protease inhibitor (MASPIN): is its impact on the prognosis in laryngeal carcinoma due to a proapoptotic effect? *Am J Otolaryngol* 2008;29:156-162

- 2. Marioni G, Giacomelli L, D'Alessandro E, Staffieri C, Guzzardo V, Staffieri A, Blandamura S. Laryngeal carcinoma recurrence rate and disease-free interval are related to CD105 expression but not to Vascular Endothelial Growth Factor 2 (Flk-1/Kdr) expression. *Anticancer research* 2008;28:551-558
  
- Marioni G, Marino F, Blandamura S, D'Alessandro E, Giacomelli L, Guzzardo V, Lionello M, De Filippis C, Staffieri A. Neoangiogenesis in laryngeal carcinoma: angiogenin and CD105 expression is related to carcinoma recurrence rate and disease-free survival. *Histopathology* 2010;57:535-543
  
- Martone T, Rosso P, Albera R, Migliaretti G, Fraire F, Pignataro L, Pruneti G, Bellone G, Cortesina G. Prognostic relevance of CD105+ microvessel density in HNSCC patient outcome. *Oral Oncology* 2005;41:147–155
  
- Mierzwa ML, Nyati MK, Morgan MA, Lawrence TS. Recent advances in combined modality therapy. *Oncologist* 2010;15:372-381
  
- Nagatsuka H, Hibi K, Gunduz M, Tsujigiwa H, Tamamura R, Sugahara T, Sasaki A, Nagai N. Various immunostaining patterns of CD31, CD34 and Endoglin and their relationship with lymph node metastasis in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2005; 34:70–76



- Pungh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* 2003;9:677-684
- Riedel F, Goette K, Schwalb J, Schaefer C, Hoermann K. Vascular endothelial growth factor expression correlates with p53 mutation and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Acta Otolaryngol* 2000;120:105-111
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-674.
- Saxena SK, Rybak SM, Davey RT, Youle RJ, Ackerman EJ. Angiogenin is a cytotoxic, tRNA-specific ribonuclease in the RNase A superfamily. *The Journal of Biological Chemistry* 1992;267:1982-21986
- Schimming R, Marmè D. Endoglin (CD105) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 2002;24:151-156
- Schimming R, Reusch P, Kuschnierz J, Schmelzeisen R. Angiogenic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity: do they have prognostic relevance? *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2004;32:176–181
- Schimming R, Marmè D. Endoglin (CD105) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 2002;24:151-156

- Schimming R, Reusch P, Kuschnierz J, Schmelzeisen R. Angiogenic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity: do they have prognostic relevance? *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2004;32:176–181
  
- Solomon LA, Munkarah AR, Schimp VL, Arabi MH, Morris RT, Nassar H, Ali-Fehmi R. Maspin expression and localization impact on angiogenesis and prognosis in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006;101:385-389
  
- Song SY, Lee SK, Kim DH, Son HJ, Kim HJ, Lim YJ, Lee WY, Chun HK, Rhee JC. Expression of maspin in colon cancers: its relationship with p53 expression and microvessel density. *Dig Dis Sci* 2002;47:1831-1835
  
- Sopel M, Kasprzyk I, Berdowska I. Maspin and c-erbB-2 expression in correlation with microvessel density in invasive ductal breast cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2005;43:109-116
  
- Sorrentino S. and Libonati M. Structure-function relationships in human ribonucleases: main distinctive features of the major RNase types. *FEBS Lett* 1997;404:1–5
  
- Stell PM. Prognosis in laryngeal carcinoma: tumour factors. *Clin Otolaryngol* 1990;15:69-81

- Tanaka F, Ishikawa S, Yanagihara K, Myahara R, Kawano Y, Li M, Otake Y, Wada H. Expression of angiopoietins and its clinical significance in non-small cell lung cancer. *Cancer Research* 2002;62:7124–7129
- 1. Tan GH, Wei YQ, Tian L, et al. Active immunotherapy of tumors with a recombinant xenogenic endoglin as a model antigen. *Eur J Immunol* 2004;34:2012-2021
- 2. Tan GH, Tian L, Wei YQ, et al. Combination of low-dose cisplatin and recombinant xenogenic endoglin as a vaccine induces synergistic antitumor activities. *Int J Cancer* 2004;112:701-706. *Eur J Immunol* 2004;112:701-706
- Tavani A, Negri E, Franceschi S, Barbone F, La vecchia C. Attributable risk for laryngeal cancer in northern Italy. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1994;3:121-125
- Tello-Montoliu A, Patel JV, Lip GYH. Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications. *J Thromb Haemost* 2006;4:1864–1874
- Thorpe PE. Vascular targeting agents as cancer therapeutics. *Clinical Cancer Research* 2004;10:415–427
- Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1999;9:211-220

- Wang MC, Yang YM, Li XH, Dong F, Li Y. Maspin expression and its clinicopathological significance in tumorigenesis and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2004 1;10:634-637
- Yoshioka N, Wang L, Kishimoto K, Tsuji T, Hu G. A therapeutic target for prostate cancer based on angiogenin-stimulated angiogenesis and cancer cell proliferation. *PNAS* 2006;103:14519–14524
- Zhang M, Volpert O, Shi YH, Bouck N. Maspin is an angiogenesis inhibitor. *Nat Med.* 2000;6:196-199
- Zhang W, Shi HY, Zhang M. Maspin overexpression modulates tumor cell apoptosis through the regulation of Bcl-2 family proteins. *BMC Cancer.* 2005;5:50
- Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, Thor A, Neveu M, Sheng S, Rafidi K, Seftor E, Sager R. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science.* 1994 28;263:526-529

## APPENDICE

### *Tabella*

<b>Stimolatori</b>	<b>Inibitori</b>
<i>Peptici</i>	<i>Peptidi</i>
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	Angiostatina
Fibroblast Growth Factor (FGF)	Endostatina
Transforming Growth Factor (TGF $\alpha$ e TGF $\beta$ )	Interferoni
Tumor Necrosis Factor (TNF $\alpha$ , basse dosi)	TNF $\alpha$ (alte dosi)
Hepatocyte Growth Factor (HGF)	Inibitori delle metalloprotenasi (TIMP)
Trombospondin-1	Somatostatina
IL-8	
Tie2 ligando	
Angiogenina	
Insulin-like Growth Factor (IGF-1)	
<i>Non peptidi</i>	<i>Non peptidi</i>
Estrogeni	Acido retinoico
Platelet Activating Factor (PAF)	Ialuronato (alto PM)
Ialuronato (a basso PM)	
Eparina	
Prostaglandine E1 E2	

*Tabella 1: Fattori di regolazione dell'angiogenesi (Klohs, 1999)*

1	ptRNasi	ribonucleasi di tipo pancreatico
2	nptRNasi	ribonucleasi di tipo non pancreatico
3	pt/nptRNasi	proteine strutturalmente più affini alle ptRNasi ma che possiedono caratteristiche catalitiche comuni alle ptRNasi e alle nptRNasi
4	angRNasi	ribonucleasi con attività angiogenica

*Tabella 2: Ribonucleasi (Sorrentino e Libonati, 1997)*

	<i>pT1</i>	<i>pT2</i>	<i>pT3</i>	<i>pT4</i>
<i>numero pazienti</i>	33	34	24	13
	<i>N0</i>	<i>N1</i>	<i>N2</i>	<i>N3</i>
<i>numero pazienti</i>	59	5	16	1
	<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	
<i>numero pazienti</i>	29	49	26	

*Tabella 3: distribuzione dei pazienti per pT, N e G della neoplasia*

0	meno di 1 vaso marcato per campo
1	lieve marcatura endoteliale in 1 vaso per campo
2	colorazione endoteliale in 2 o 3 vasi per campo
3	colorazione endoteliale in più di 3 vasi per campo

*Tabella 4: Espressione di Angiogenina (Score) a livello dell'endotelio dei vasi neoformati*

<b>TNM</b>	<b>Numero di pazienti</b>	<b>% media di Maspina nucleare ± SD</b>
pT1	33	13.27 ± 23.21
pT2	34	7.24 ± 17.59
pT3	24	7.29 ± 17.67
pT4	13	10.77 ± 20.45
N0 (cN0+pN0)	82	1.55 ± 4.44
N+	22	11.68 ± 21.66
G1	29	9.00 ± 19.82
G2	49	11.04 ± 2.58
G3	26	7.38 ± 18.53
Senza recidiva loco-regionale	70	12.76 ± 22.84
Con recidiva loco-regionale	34	2.97 ± 7.75

*Tabella 5: Espressione media di Maspina nucleare in differenti sottogruppi clinico-patologici.*

<b>Score di Angiogenina nelle cellule endoteliali</b>	<b>Nr. Casi*</b>	<b>Espressione media di Angiogenina nelle cellule di carcinoma (%) ± SD</b>
0	46	11.70 ± 23.77
1	28	18.00 ± 28.51
2	17	26.88 ± 39.01
3	12	69.50 ± 26.23

*Tabella 6: Espressione di Angiogenina nelle cellule di carcinoma squamoso della laringe e score di Angiogenina nelle cellule endoteliali dei vasi neoplastici.*

*\* In 1 caso non è stato possibile determinare lo score di Angiogenina nelle cellule endoteliali dei vasi tumorali.*

Markers biologici e parametri clinico-patologici e prognostici	Test statistico	P
Pattern di Maspina e dimensione della neoplasia primitiva (pT)	Fisher's exact test	0.16
Pattern di Maspina e stato linfonodale (N)	Fisher's exact test	0.12
Pattern di Maspina e gradiente isto-patologico (G)	Fisher's exact test	0.63
Percentuale di Maspina nucleare e pT	Log-rank test	0.50
Percentuale di Maspina nucleare e G	Mann-Whitney U test	0.79
Percentuale di Maspina nucleare e stadio	Mann-Whitney U test	0.15
Espressione endoteliale di Angiogenina e pT	Modello di regressione di Cox	0.18
Espressione endoteliale di Angiogenina e N	Mann-Whitney U test	0.93
Espressione endoteliale di Angiogenina e G	Mann-Whitney U test	0.67
Espressione endoteliale di Angiogenina e stadio	Mann-Whitney U test	0.33
Espressione endoteliale di Angiogenina e sopravvivenza libera da malattia	Modello di regressione di Cox	0.21
Percentuale di espressione di Angiogenina nelle cellule neoplastiche (SCC) e pT	Modello di regressione di Cox	0.44
Percentuale di espressione di Angiogenina nelle SCC e N	Mann-Whitney U test	0.72
Percentuale di espressione di Angiogenina nelle SCC e G	Mann-Whitney U test	0.15
Percentuale di espressione di Angiogenina nelle SCC e stadio	Mann-Whitney U test	0.56
Percentuale di espressione di Angiogenina nelle SCC e recidiva neoplastica loco-regionale	Mann-Whitney U test	0.14
Percentuale di espressione di Angiogenina nelle SCC e sopravvivenza libera da malattia	Modello di regressione di Cox	0.14
Espressione di Endoglin (CD105) e pT	Modello di regressione di Cox	0.55
Espressione di CD105 e N	Mann-Whitney U test	0.46
Espressione di CD105 e G	Mann-Whitney U test	0.42
Espressione di CD105 e stadio	Mann-Whitney U test	0.81
Percentuale di Maspina nucleare e espressione endoteliale di Angiogenina	Spearman's rank correlation	0.47
Percentuale di Maspina nucleare e percentuale di espressione di Angiogenina nelle SCC	Spearman's rank correlation	0.97
Percentuale di Maspina nucleare e espressione di CD105	Spearman's rank correlation	0.28
Pattern di Maspina e espressione di CD105	Mann-Whitney U test	0.23
Pattern di Maspina e percentuale di espressione di Angiogenina nelle SCC	Mann-Whitney U test	0.38
Pattern di Maspina e espressione endoteliale di Angiogenina	Mann-Whitney U test	0.46

*Tabella 7: Correlazioni statisticamente non significative tra i marcatori biologici studiati ed i parametri clinico-patologici e prognostici analizzati*



	<b>Numero di pazienti</b>	<b>Espressione media di Angiogenina nelle SCC (%) ± SD</b>	<b>Espressione media di CD105 nelle cellule endoteliali (%) ± SD</b>
pT1	33	17.82 ±31.39	5.75±4.37
pT2	34	23.27 ±34.64	7.88 ±5.97
pT3	24	18.83 ±30.31	8.73 ±9.81
pT4	13	30.46±35.63	6.79 ±3.98
N0 (cN0+pN0)	82	22.93 ±34.12	7.19 ±5.63
N+	22	14.77±24.87	7.54 ±9.17
Stadio I	33	17.82 ±30.90	5.75 ± 4.3
Stadio II	27	27.37 ±36.18	8.28±5.51
Stadio III	19	12.68±24.54	7.75±7.25
Stadio IV	25	25.48±33.46	7.81 ±8.62
G1	29	16.24±30.35	5.55 ±4.9
G2	49	24.31±34.75	8.69 ±7.60
G3	26	22.73±30.94	6.90 ± 5.2
Senza recidiva loco-regionale	70	18.03±30.23	6.0±5.22
Con recidiva loco-regionale	34	29.15±36.10	10.18±7.89

*Tabella 8: Espressione di Angiogenina e CD105 in differenti sottogruppi clinico-patologici.*

<b>Pattern di azione della Maspina</b>	<b>Numero di pazienti</b>	<b>Espressione media di CD105 nelle cellule endoteliali (%) ± SD</b>
Nucleare	71	7.2 ± 7.0
Non nucleare	33	7.6 ± 5.2

*Tabella 9: Distribuzione del pattern di espressione di Maspina e MVD calcolata mediante l'espressione di CD105.*

<b>Sottopopolazione N0: markers biologici e parametri clinico-patologici e prognostici</b>	<b>Test statistico</b>	<b>p</b>
Percentuale di Maspina nucleare e sopravvivenza libera da malattia	Modello di regressione di Cox	0.11
Espressione di Angiogenina nelle SCC e recidiva neoplastica loco-regionale	Mann-Whitney U test	0.13

*Tabella 10: Correlazioni statisticamente non significative tra i marcatori biologici studiati ed i parametri clinico-patologici e prognostici nella sottopopolazione N0*

## Grafici

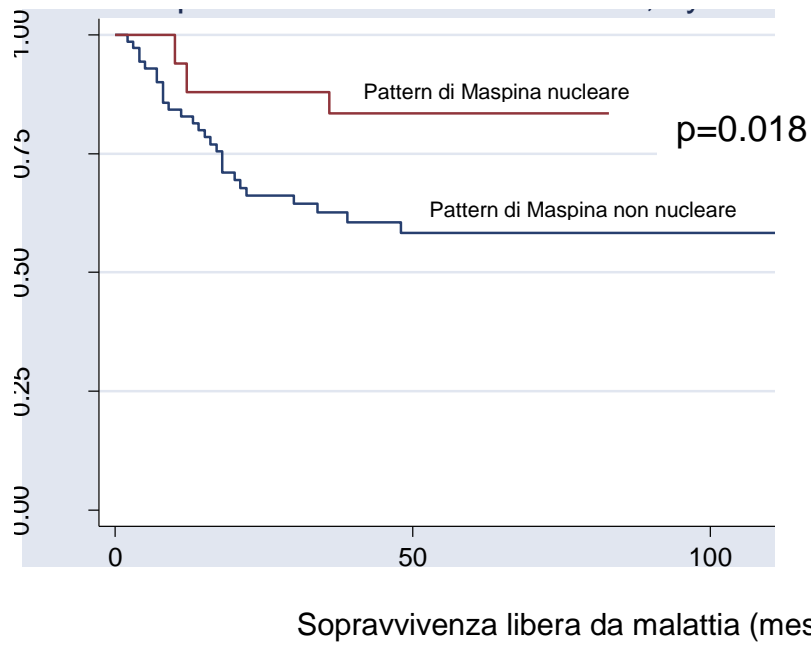


Grafico 1: Pattern di espressione sub-cellulare di Maspina e sopravvivenza libera da malattia.

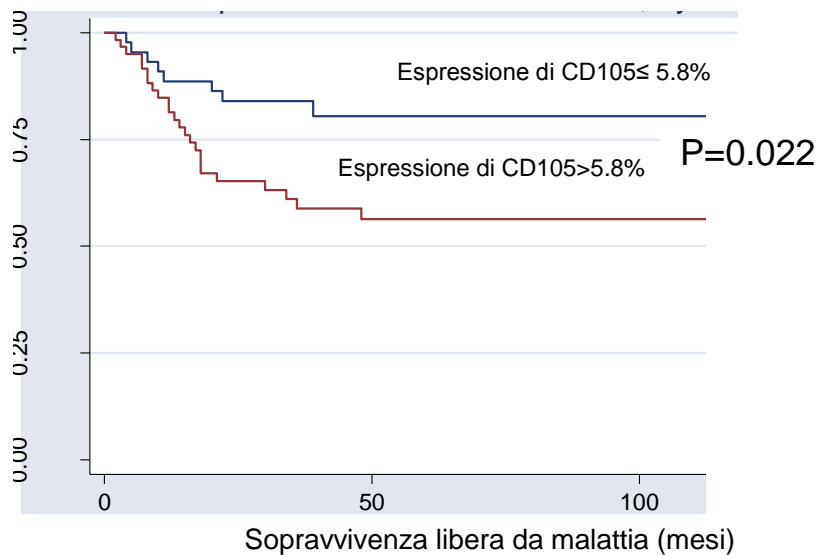


Grafico 2: Espressione di CD105 nelle cellule endoteliali dei vasi neoplastici e sopravvivenza libera da malattia.

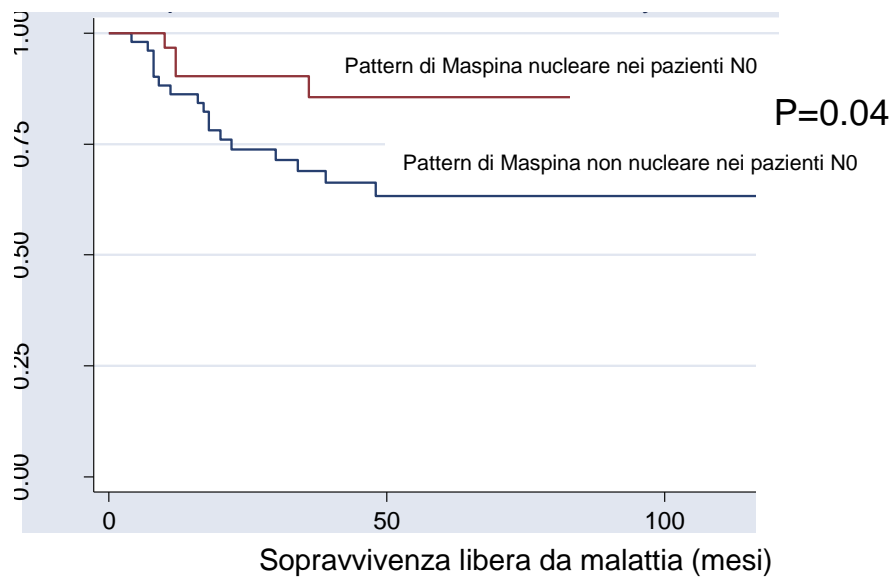


Grafico 3: Pattern di espressione sub-cellulare di Maspina nelle cellule neoplastiche dei pazienti N0 e sopravvivenza libera da malattia.

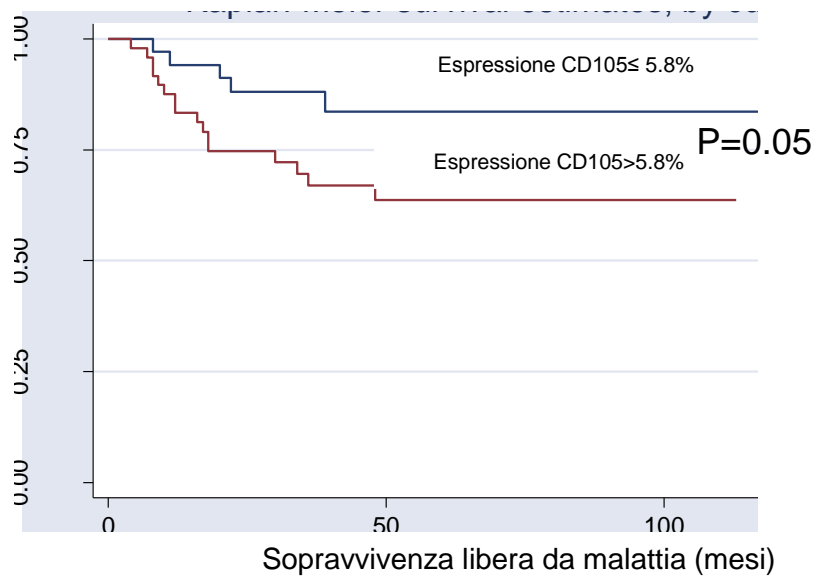
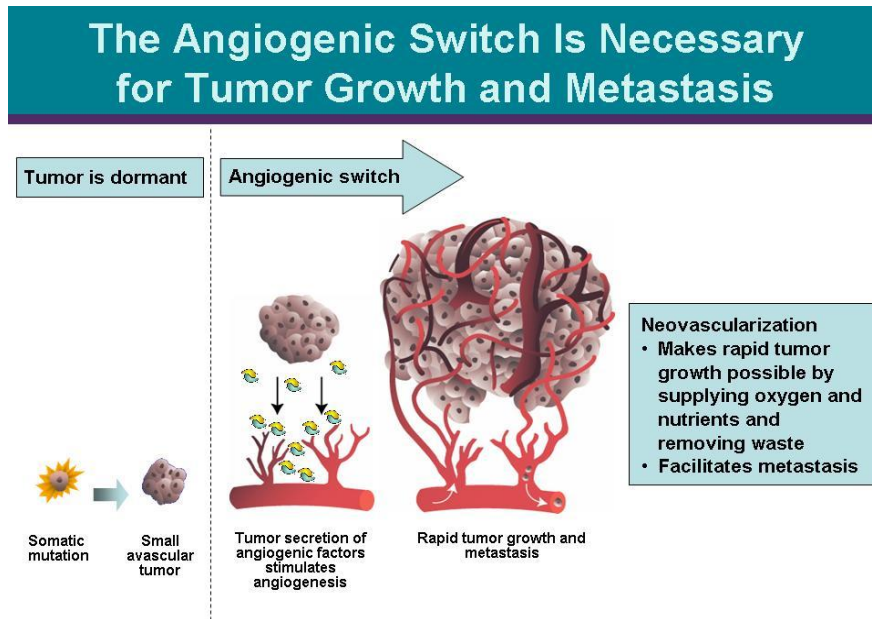


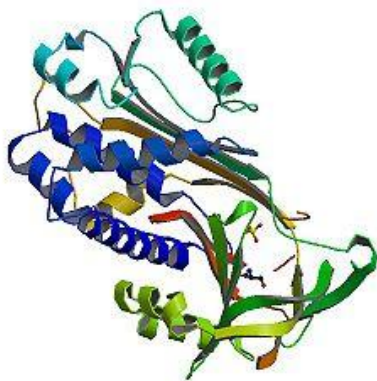
Grafico 4: Espressione di CD105 nelle cellule endoteliali dei vasi neoplastici nei pazienti N0 e sopravvivenza libera da malattia.

*Figure*



Carmeliet and Jain. *Nature*. 2000;407:249; Bergers and Benjamin. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:401.

*Figura 1: meccanismo della neoangiogenesi*



*Figura 2: Struttura terziaria di Maspina*

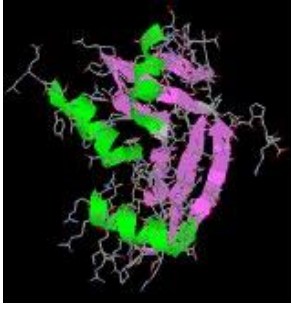


Figura 3: Struttura terziaria di Angiogenina

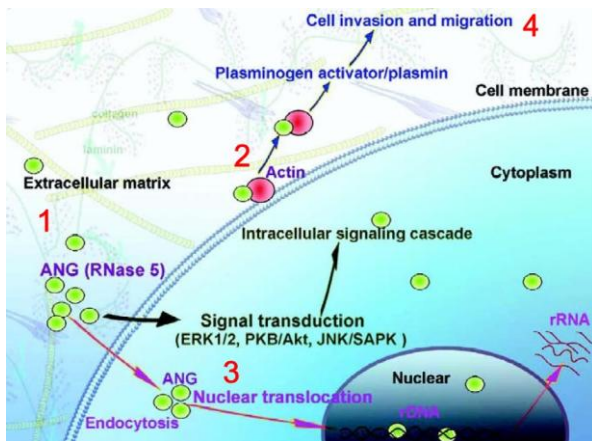


Figura 4: Meccanismo d'azione di Angiogenina (Gao e Xu, 2008).

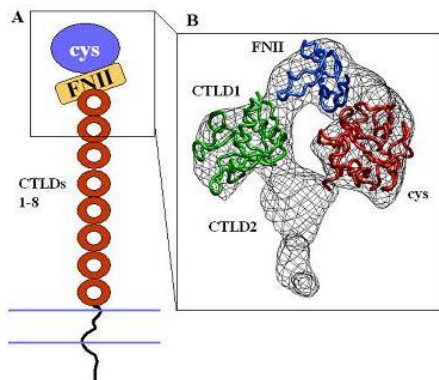


Figura 5: CD105 (Endoglina)

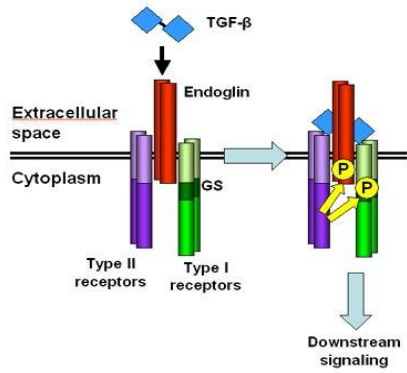


Figura 6: Meccanismo d'azione di Endoglina

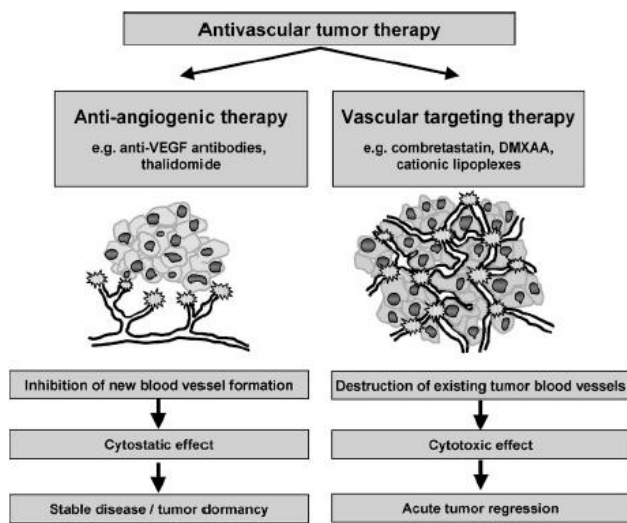
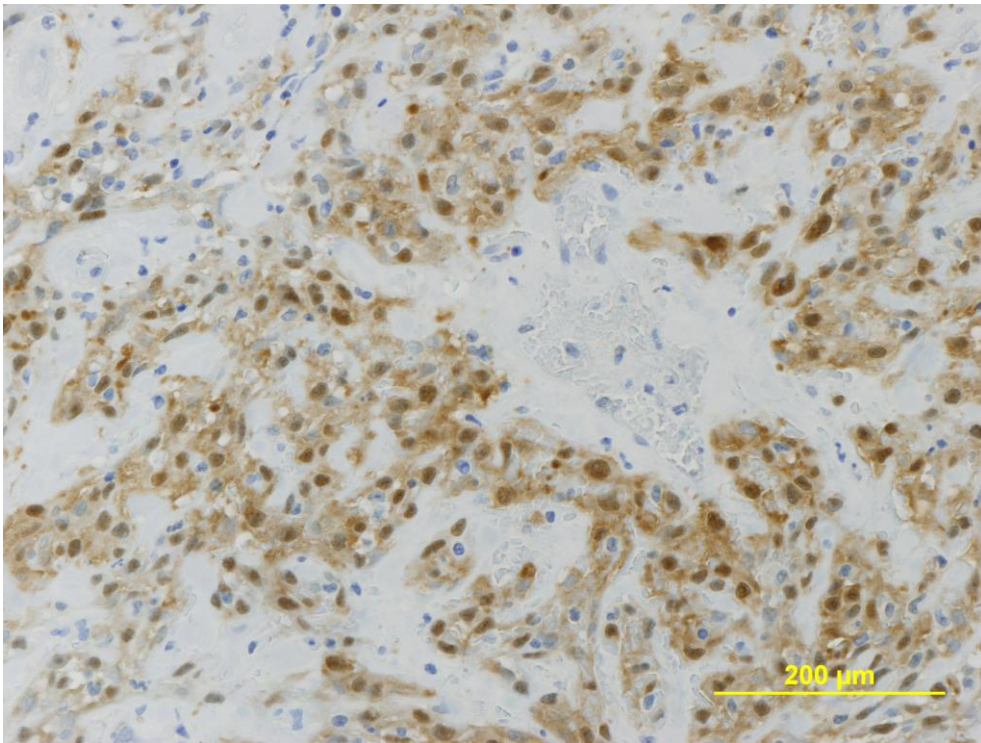
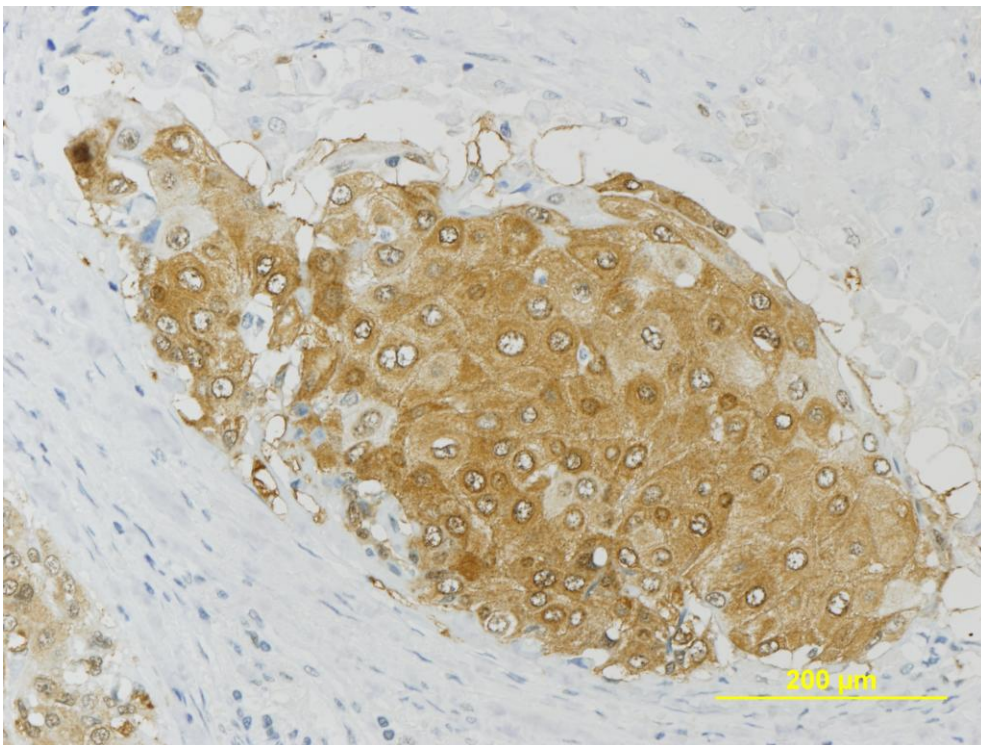


Figura 7: Terapia neoplastica antivascolare (Eichhorn et al, 2004)

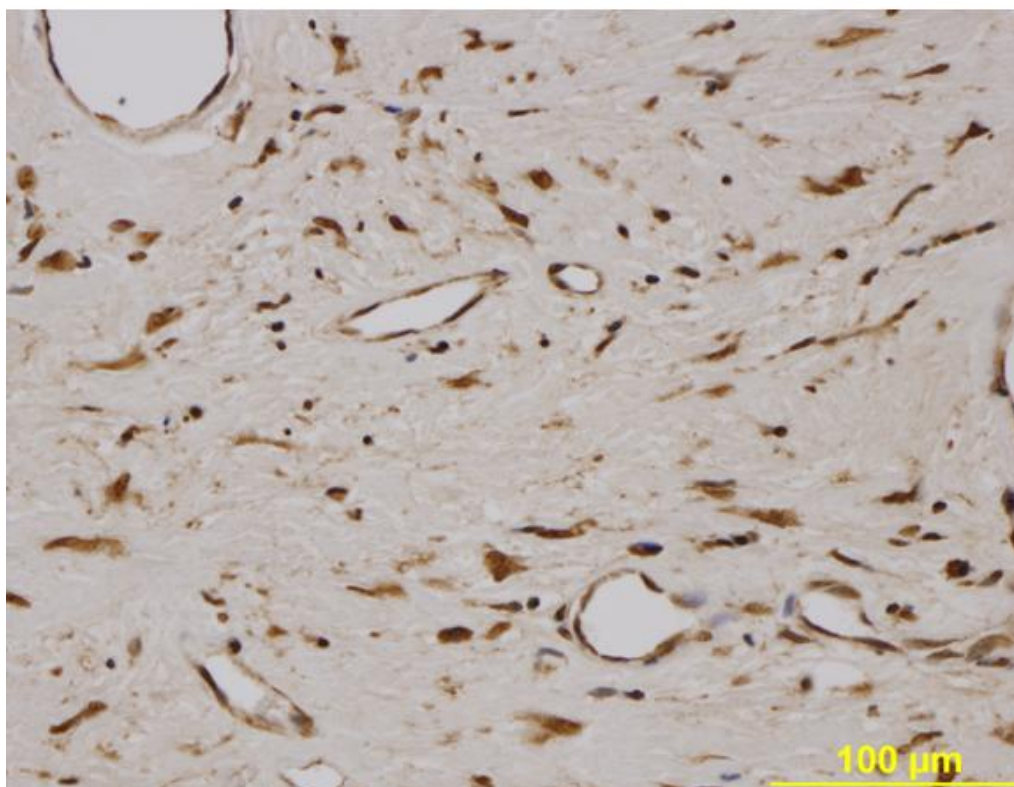
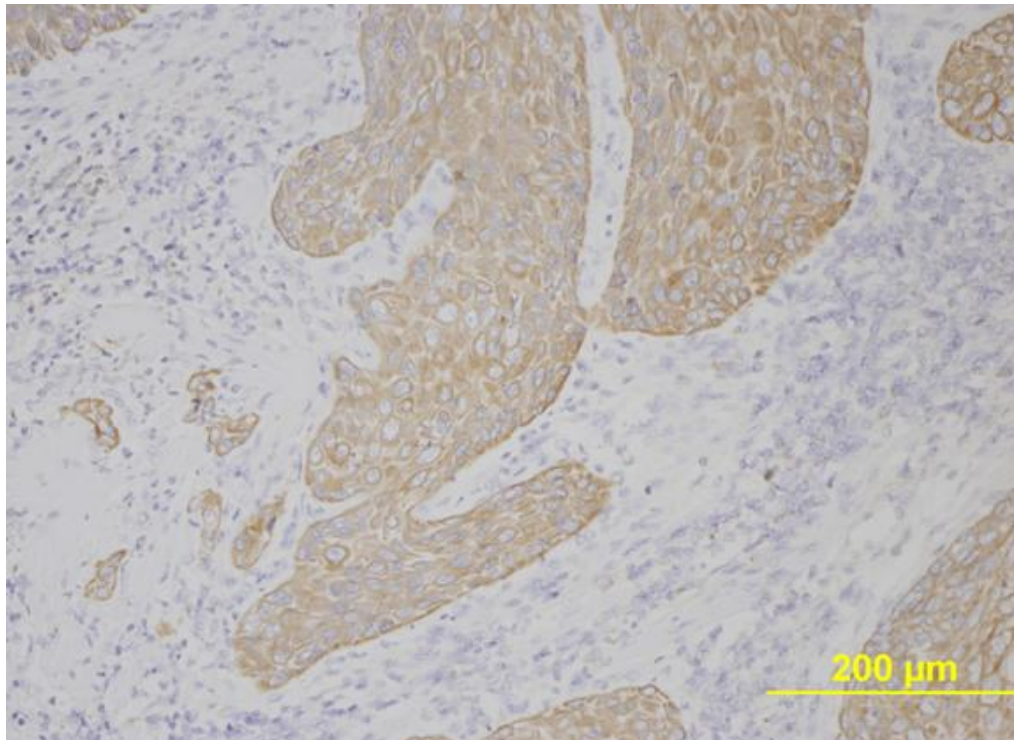


*Figura 8a: Pattern di espressione non nucleare di Maspina*

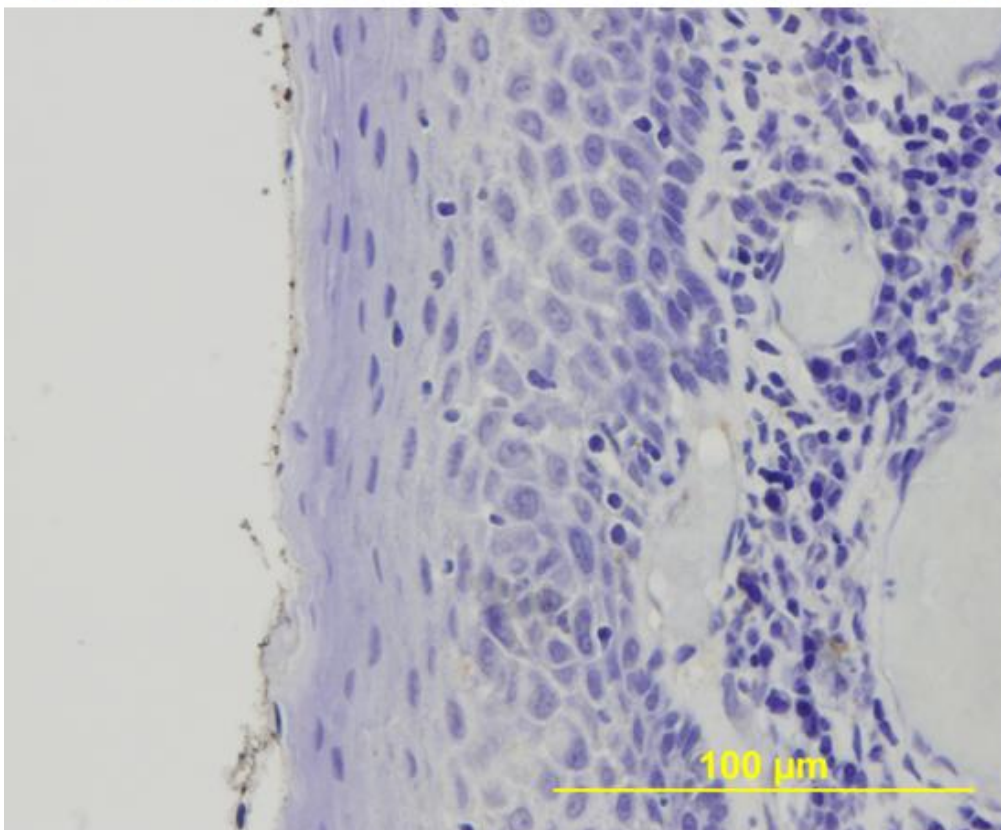
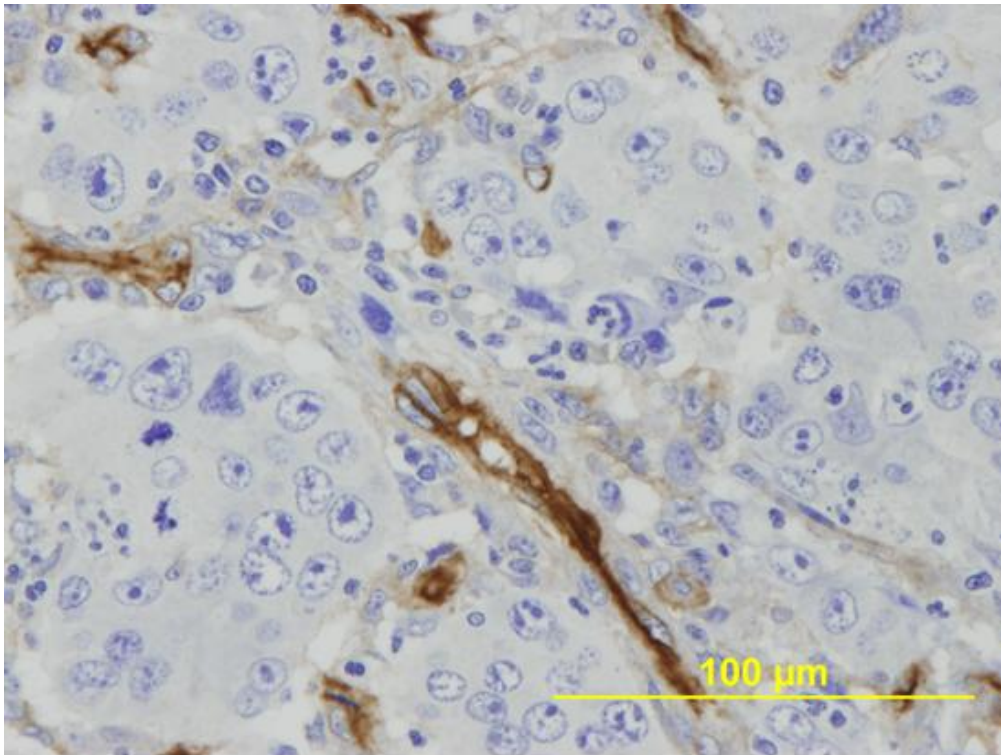


*Figura 8b: Pattern di espressione nucleare di Maspina*





*Figura 9: In alto, Angiogenina espressa nelle cellule di carcinoma; in basso, vasi in tessuto neoplastico con espressione di Angiogenina*



*Figura 10: In alto, CD105 espresso nell'endotelio neoformato; in basso, vasi in tessuto perineoplastico sano. Si noti come nel secondo caso CD105 non sia espresso a livello endoteliale.*