



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA**

**in Tecnologie innovative nelle malattie dello scheletro,  
della cute e del distretto oro-cranio-facciale**

**TESI SPERIMENTALE DI DOTTORATO**

**Profilo IHC di fattori trofici nei  
tessuti normali e in alcuni tumori del  
distretto testa-collo**

Relatore

**Chiar.mo Prof. Marco Artico**

Candidato

**Dott.ssa Maria Teresa Santarelli**

**Matricola 1680144**

Anno Accademico 2021/2022

# Indice

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Indice</b>   | <b>ii</b> |
| <b>Elenco delle figure</b>  | <b>v</b>  |
| <b>1 Introduzione</b>   | <b>1</b>  |
| Fattori Trofici.....  | 1         |
| Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) .....                                       | 2         |
| Fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) .....                                   | 5         |
| Neurotrofine .....  | 6         |
| TNF- $\alpha$ 13  |           |
| <b>2 Descrizione dei fattori trofici in tessuti patologici del distretto testa-collo 16</b> |           |
| Fattori trofici negli adenomi ipofisari umani.....  | 17        |
| NGF (Nerve Growth Factor) .....   | 17        |
| TGF- $\beta$ (Transforming Growth Factor - $\beta$ ) .....                                  | 18        |
| CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) .....  | 19        |
| GDNF (Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor) .....                                    | 19        |
| VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) .....   | 19        |
| FGFs (Fibroblast Growth Factors) .....  | 20        |

|   |           |
|---|-----------|
| EGF (Epidermal Growth Factor).....  | 21        |
| Fattori trofici nei gliomi cerebrali .....                                      | 22        |
| Fattori di crescita nei meningiomi e nei tessuti normali della dura madre ..... | 24        |
| Fattori trofici nello schwannoma vestibolare .....                              | 25        |
| I fattori trofici nella tonsilla linguale umana .....                           | 27        |
| Fattori trofici nei paragangliomi giugulo-timpanici.....                        | 28        |
| <b>3 Scopo dello studio</b>   | <b>30</b> |
| L'angiofibroma nasofaringeo giovanile (JNA) .....                               | 31        |
| Epidemiologia .....   | 31        |
| Patogenesi .....  | 31        |
| Anatomia Patologica.....  | 32        |
| Storia naturale del tumore .....  | 33        |
| Quadro clinico.....   | 35        |
| Indagini pre-operatorie .....   | 36        |
| Terapia.....  | 37        |
| Chirurgia .....   | 38        |
| <b>4 Materiali e Metodi</b>   | <b>40</b> |
| Pazienti .....  | 40        |
| Preparazione delle sezioni istologiche in paraffina.....                        | 40        |
| Colorazione Ematossilina / Eosina.....  | 46        |
| Protocollo colorazione Ematossilina / Eosina.....                               | 47        |
| Tecnica immunostochimica .....  | 48        |
| Protocollo IHC .....  | 61        |

|          |                     |           |
|----------|---------------------|-----------|
| <b>5</b> | <b>Risultati</b>    | <b>64</b> |
| <b>6</b> | <b>Discussione</b>  | <b>75</b> |
| <b>7</b> | <b>Conclusioni</b>  | <b>83</b> |
| <b>8</b> | <b>Bibliografia</b> | <b>85</b> |

# Elenco delle figure

|  |   |
|--|---|
| Trasduzione del segnale da parte del recettore del TGF- $\beta$ 1 con fosforilazione dei fattori di trascrizione SMAD che traslocano nel nucleo e riconoscono le sequenze promotrici dei geni bersaglio di cui regolano la trascrizione.....   | 3 |
| Grafica al computer di TGF-beta. Il TGF-beta è una citochina con tre diverse isoforme, che regola molte funzioni cellulari tra cui la proliferazione cellulare, la differenziazione, l'adesione e la migrazione.....   | 4 |
| Tipi di VEGF e loro recettori.....   | 5 |
| Induzione dell'angiogenesi attraverso il legame di VEGF-A con il recettore VEGFR-2. 1) Gli attivatori stimolano la produzione di VEGF; 2) VEGF si lega ai recettori sulle cellule endoteliali; 3) L'angiogenesi è mediata primariamente attraverso l'interazione di VEGF-A con VEGFR-2; 4) Altre varianti di VEGF e VEGFR giocano un ruolo in questo processo..... | 6 |
| Struttura dell'NGF.....  | 7 |
| Mediazione della risposta infiammatoria da parte dell'NGF.....   | 9 |

|  |    |
|--|----|
| Via di trasduzione del segnale del recettore TNFR1. In seguito al legame di TNF- $\alpha$ al recettore TNFR1 segue il reclutamento delle proteine TRADD (Tumor receptor associated death domain protein), RIP (Receptor interactin protein), TRAF2 (TNF receptor associated factor 2) e FADD (Fas-associated death domain protein) con attivazione di numerosi pathways di segnale che portano all'infiammazione e all'apoptosi..... | 15 |
| Inclusione in paraffina, i processi sono brevemente citati e possono subire modificazioni sia nel tipo che nei tempi secondo il tipo di tessuto.....   | 44 |
| Tipi di taglio, in seguito ad inclusione in paraffina.....   | 45 |
| Reazione di ossidazione in seguito a legame del colorante con il tessuto.....  | 47 |
| Struttura anticorpo, esplicitando le parti costanti e variabili, le catene pesanti e leggere e il sito di legame specifico dell'antigene.....  | 50 |
| Schema illustrato della produzione di anticorpi monoclonali.....   | 51 |
| Relazione tra anticorpo primario e secondario.....   | 54 |
| Schema possibili interazioni tra Ab I° e Ab.....   | 56 |
| Struttura chimica della molecola di Biotina o Vitamina H.....  | 58 |

Fig.A Angiofibroma. Età 16 anni. Espressione immunoistochimica del fattore di crescita TGF- $\beta$  (20x). Esame microscopico: la neoformazione appare costituita da una proliferazione di strutture vascolari di calibro variabile ora filiformi ora di aspetto lacunare, rivestite da un singolo strato di cellule endoteliali. Tali vasi sono immersi in uno stroma connettivo fibroso per lo più denso con fibroblasti fusati o stellati prevalentemente a disposizione perivascolare. Si evidenzia all'interno dei vasi la presenza di globuli di materiale estraneo amorfo verosimilmente riferibile a embolizzazione. Fig.B Tessuto normale di controllo in cui sono assenti i fibroblasti perivascolari.....68

Angiofibroma Età: 16 anni. Espressione immuno-istochimica del fattore di crescita TGF (40x). L'analisi immunoisto-chimica ha mostrato positività per il fattore di crescita TGF- $\beta$ .....68

Fig.A Angiofibroma Età: 14 anni. Espressione immunoistochimica del fattore di crescita VEGF (20x). Marcata espressione di VEGF a livello dell'endotelio ghiandolare. Fig.B Tessuto normale di controllo in cui non risulta presente l'espressione del VEGF.....69

Fig.A Angiofibroma Età:14 anni (G-13069). Espressione immunoistochimica del fattore di crescita VEGF (40x). Esame microscopico: la neoformazione appare costituita da una proliferazione di strutture vascolari, il VEGF è risultato ampiamente espresso a livello dell'endotelio vascolare. Fig.B Tessuto normale di controllo in cui il VEGF non risulta espresso,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,69

Fig.A Angiofibroma Età: 14 anni (G-13069). Espressione immunoistochimica del fattore di crescita TNF (40x). Esame microscopico: la neoformazione appare costituita da una proliferazione di strutture vascolari che hanno mostrato forte positività per il TNF. Fig.B Tessuto normale di controllo in cui non risulta

presente l'espressione del TNF.....70

Angiofibroma Età: 14 anni. Espressione immunoistochimica del fattore di crescita TGF. Marcata espressione del TGF a livello citoplasmatico, modificazione della ECM con evidente proliferazione dei miofibroblasti....70

Angiofibroma Età: 14 anni. Espressione immunoistochimica del fattore di crescita VEGF (40x). Esame microscopico: mucosa di tipo respiratorio con proliferazione neoplastica costituita da tessuto fibroso ipocellulare che circoscrive numerosi canali vascolari. VEGF è risultato espresso a livello dell'epitelio ghiandolare.....71

Fig.A Angiofibroma Età: 14 anni. Espressione immunoistochimica del fattore di crescita TNF (20x). Esame microscopico: mucosa di tipo respiratorio con proliferazione neoplastica costituita da tessuto fibroso ipocellulare che circoscrive numerosi canali vascolari, forte immunoreattività citoplasmatica per TNF.

Fig.B Tessuto normale di controllo in cui è presente solo lievemente l'espressione del TNF.....71

Fig.A Angiofibroma Età: 14 anni. Espressione immunoistochimica del fattore di crescita TGF (40x). Esame microscopico: proliferazione neoplastica costituita da tessuto fibroso ipocellulare che circoscrive numerosi canali vascolari. Fig.B

Tessuto normale di controllo in cui è presente solo lievemente l'espressione  
del TNF- $\beta$  .....72

# Capitolo 1

## Introduzione

### Fattori Trofici

I fattori trofici sono sostanze specifiche che intervengono sulla crescita e sulla migrazione delle cellule, sulla loro sopravvivenza e sull'apoptosi. Sono proteine secrete *in vivo* da specifiche cellule e vengono riversate nel circolo sanguigno oppure rilasciate nei tessuti circostanti legandosi ai recettori sulla membrana cellulare. Pur rivolgendosi a bersagli cellulari preferenziali, hanno anche uno spiccato pleiotropismo su molteplici tipi cellulari. La maggior parte dei fattori trofici agisce con meccanismo paracrino, quindi a breve distanza, ed è presente nei liquidi intracellulari a basse concentrazioni; essi si legano a proteine della matrice extracellulare o alle cellule staminali e ciò ne incrementa la concentrazione facilitandone il legame con il recettore specifico, che può essere collocato sulla membrana cellulare o all'interno della cellula. Talora il fattore di crescita viene espresso dalle stesse cellule che ne esprimono il recettore (meccanismo autocrino).

Altre volte i fattori trofici agiscono a distanza (meccanismo endocrino), come nel caso dell'eritropoietina. Ogni cellula possiede di solito alcune centinaia di recettori con alta affinità

e specificità di cui alcuni sono recettori catalitici, dotati di attività protein-chinasica, mentre altri interagiscono con la proteina G attivando l'adenil-ciclasi o la fosfolipasi C. Molti fattori trofici sono codificati da proto-oncogeni, il cui studio ha permesso di capire le vie di controllo della proliferazione cellulare. I fattori trofici si possono raggruppare in grandi famiglie di proteine simili da un punto di vista strutturale tra cui le famiglie di: TGF- $\beta$  (fattore di crescita trasformante  $\beta$ ), BMP (proteina morfogenetica dell'osso), neurotrofine (NGF, BDNF e NT3), FGF (fattore di crescita dei fibroblasti), VEGF (fattore di crescita dell'endotelio vascolare), TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor-alfa). Altri fattori di crescita conosciuti sono: Fattore stimolante le colonie macrofagiche (Macrophage Colony-Stimulating Factor, M-CSF); Fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF); Fattore di crescita insulino-simile (IGF1); Eritropoietina (EPO); Trombopoietina (TPO); Miostatina (GDF-8); Growth Differentiation Factor-9 (GDF9).

### **Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ )**

Il TGF- $\beta$  è un fattore di crescita che svolge la sua azione principale a livello del sistema immunitario inibendo la proliferazione e l'attivazione di linfociti e leucociti; inoltre, esso esercita azioni pro- o anti-infiammatorie a seconda del processo a livello del quale esso viene sintetizzato e a seconda che sia espresso a livello locale o sistemico. I TGF- $\beta$  sono una famiglia di sostanze codificate da geni diversi chiamate TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3, di cui il TGF- $\beta$ 1 è molto diffuso nelle cellule endoteliali, nel connettivo e nel sangue mentre il TGF- $\beta$ 2 nell'epitelio e nei neuroni e il TGF- $\beta$ 3 si trova soprattutto nei fibroblasti. Il TGF- $\beta$ 1 è una proteina omodimerica sintetizzata e secreta dalle cellule del sistema immunitario tipo i linfociti T e i fagociti mononucleati. L'omodimero deriva dalla scissione proteolitica del suo precursore, che avviene a livello dell'apparato del Golgi, e

si ottiene poi la forma matura di TGF- $\beta$ 1 secreta in associazione ad altri polipeptidi che vanno poi rimossi per digestione enzimatica; in questo modo la citochina si lega al suo recettore e può esercitare le sue attività biologiche. Il recettore per il TGF- $\beta$  è formato da due proteine, ALK5 (activin receptor-like kinase) e TGF- $\beta$ RII, che trasducono il segnale attraverso un dominio ad attività serina/treoninachinasica che induce la fosforilazione dei fattori di trascrizione SMAD. Quando TGF- $\beta$  ALK5 fosforila SMAD2 e SMAD3, essi si legano a SMAD4 e traslocano nel nucleo dove riconoscono le sequenze promotrici dei geni bersaglio, regolandone la trascrizione.

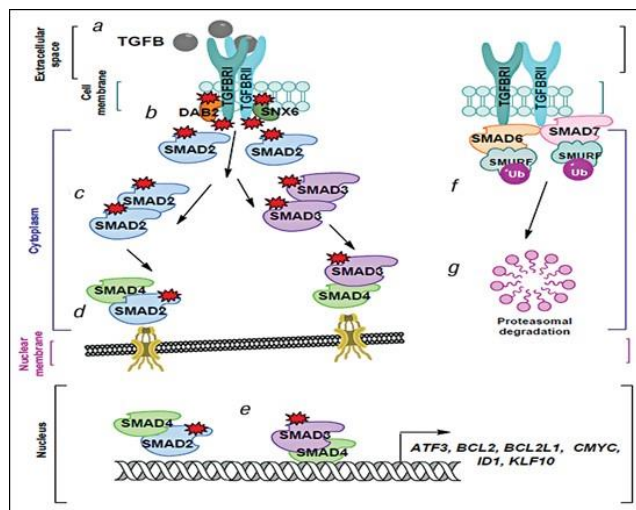


Figura 1.1: Trasduzione del segnale da parte del recettore del TGF- $\beta$ 1 con fosforilazione dei fattori di trascrizione SMAD che traslocano nel nucleo e riconoscono le sequenze promotrici dei geni bersaglio di cui regolano la trascrizione.

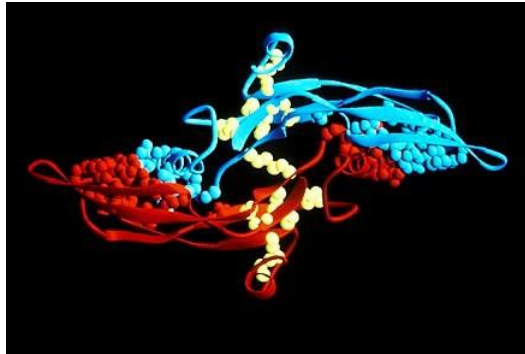
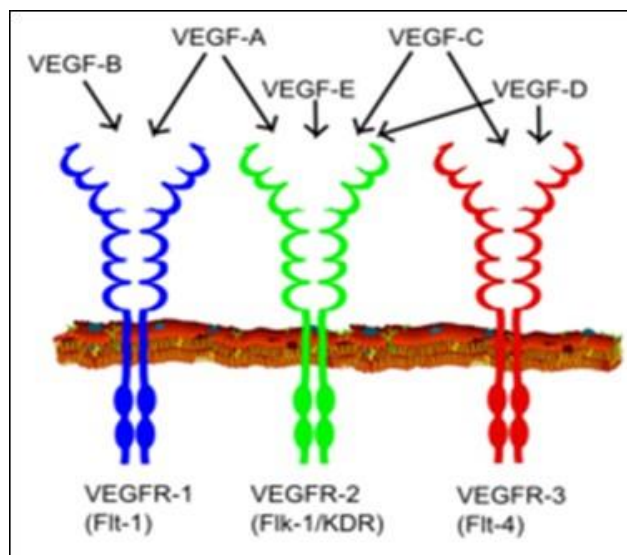


Figura 1.2: Grafica al computer di TGF-beta. Il TGF-beta è una citochina con tre diverse isoforme, che regola molte funzioni cellulari tra cui la proliferazione cellulare, la differenziazione, l'adesione e la migrazione.

Il TGF- $\beta$  svolge diverse attività biologiche: Inibisce l'attivazione dei macrofagi e la proliferazione dei linfociti T ed agisce anche su altre cellule e antagonizza gli effetti proinfiammatori indotti dalle altre citochine svolgendo il ruolo di attenuazione/terminazione delle risposte immunitarie e infiammatorie. Topi Knockout per il gene del TGF- $\beta$ 1 manifestano lesioni infiammatorie e patologie linfoproliferative. Il TGF- $\beta$ 1 regola la differenziazione di sottopopolazioni di linfociti T e può bloccare lo sviluppo delle sottopopolazioni linfocitarie TH1 e TH2. Al contrario, TGF- $\beta$  in combinazione con IL-6 potrebbe promuovere la differenziazione dei linfociti TCD4+ ad azione proinfiammatoria secernenti IL-17. Agisce inoltre sui linfociti B promuovendo lo scambio isotipico delle immunoglobuline IgA coinvolte nella risposta immunitaria a livello delle mucose. Modula il processo di riparazione stimolando nei macrofagi e nei fibroblasti la sintesi del collagene e degli enzimi coinvolti nel rimodellamento della matrice extracellulare. Infine, TGF- $\beta$  stimola il processo angiogenetico.

## Fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF)

I fattori di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) sono VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e PlGF (fattore di crescita placentare) e sono tutte proteine omodimeriche. Il VEGF-A è un forte induttore dell'angiogenesi associata all'infiammazione cronica, alla guarigione delle ferite ed ai tumori. Nei topi transgenici Knockout, che hanno un solo allele del VEGF, si determina la mortalità nell'utero a causa di gravi difetti della vasculogenesi e dell'emo-poiesi. I membri della famiglia dei VEGFs trasducono il segnale mediante tre recettori ad attività tirosin-chinasica: VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3 (Fig. 3) di cui il VEGFR-2 media gli effetti vasculogenetici e angiogenetici ed è espresso dalle cellule endoteliali e da molti altri tipi cellulari. Il VEGFR-1 è implicato nel processo infiammatorio e potrebbe favorire la mobilizzazione delle cellule staminali endoteliali. VEGF-C e VEGF-D si legano al recettore VEGFR-3 e inducono la formazione di neovasi linfatici



(linfoangiogenesi).

Figura 1.3: Tipi di VEGF e loro recettori

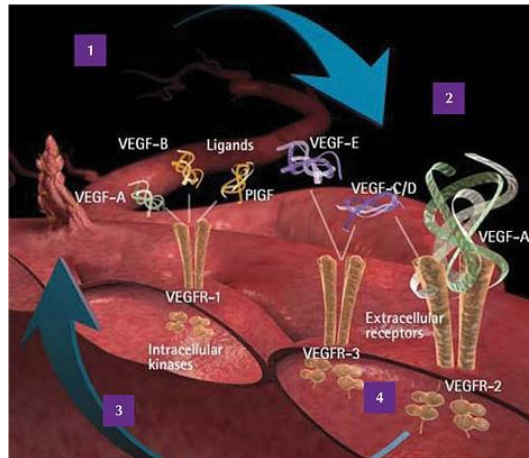


Figura 1.4: Induzione dell'angiogenesi attraverso il legame di VEGF-A con il recettore VEGFR-2. 1) Gli attivatori stimolano la produzione di VEGF; 2) VEGF si lega ai recettori sulle cellule endoteliali; 3) L'angiogenesi è mediata primariamente attraverso l'interazione di VEGF-A con VEGFR-2; 4) Altre varianti di VEGF e VEGFR giocano un ruolo in questo processo.

## Neurotrofine

Le neurotrofine costituiscono una famiglia di piccoli messaggeri proteici che svolgono un ruolo fondamentale sia nel sistema nervoso centrale sia in quello periferico. Le principali funzioni di queste proteine sono la regolazione della crescita della fibra nervosa (assone), la differenziazione neuronale e la plasticità sinaptica. Ad oggi, sono note nei mammiferi quattro neurotrofine: l'NGF, il Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3) e la neurotrofina-4 (NT-4). Essi sono derivati da un gene ancestrale comune e si assomigliano moltissimo nella sequenza degli aminoacidi e nella forma.

## Nerve growth factor

La prima neurotrofina, il Nerve Growth Factor (NGF), descritta da Rita Levi Montalcini l'11 giugno 1951, è una piccola proteina segnale coinvolta nello sviluppo del sistema nervoso

nei vertebrati, ed è composta da due unità di 118 aminoacidi. Indirizza e regola la crescita degli assoni tramite meccanismi di segnalazione cellulare, è inoltre prodotta nei momenti rigenerativi e per questo è molto utile nelle prime fasi dello sviluppo embrionale permettendo la creazione del cervello. È studiata ancora oggi per trovare una cura per alcune delle più gravi malattie che colpiscono il sistema nervoso, come la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) e la malattia di Alzheimer. Grazie alla scoperta dell'NGF, sono stati individuati altri fattori di crescita oggi studiati per la cura dei tumori, in quanto è stato dimostrato che promuovono la crescita del tumore stesso.

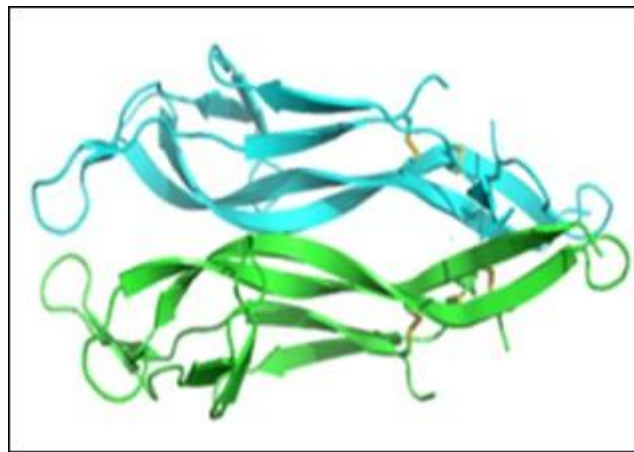
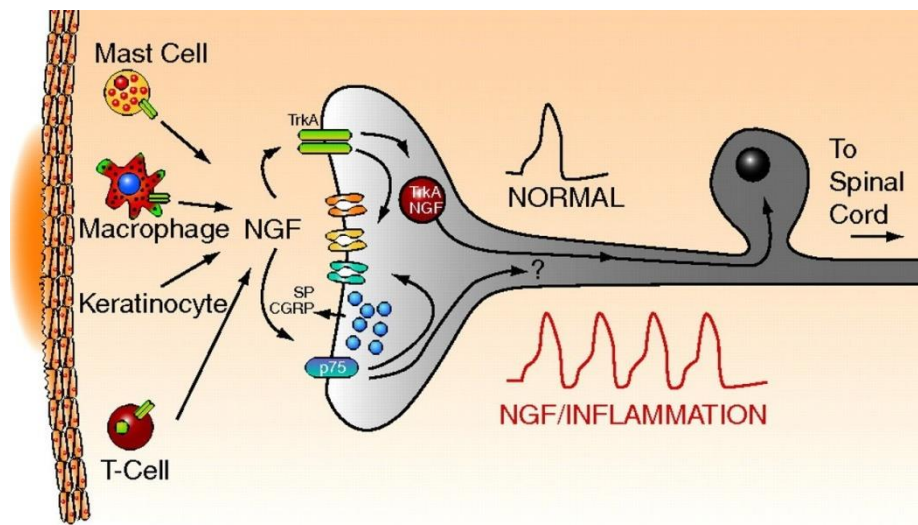


Figura 1.5: Struttura dell'NGF

Il fattore di crescita nervoso (NGF) è importante per la crescita, il mantenimento e la sopravvivenza di alcuni neuroni bersaglio e funziona anche come molecola di segnalazione. Esso è probabilmente il prototipo del fattore di crescita, in quanto è uno dei primi ad essere stato descritto. Il gene dell'NGF si trova sul braccio corto (p) del cromosoma 1 in posizione 13.1. La struttura dell'NGF è stata risolta per la prima volta mediante cristallografia a raggi X e pubblicata nel 1991 da McDonald et al. in Nature. L'NGF forma una struttura a nodo di cistina costituita da filamenti beta attorcigliati l'uno attorno all'altro e collegati da legami disolfuro. La maggior parte delle strutture sono dimeriche. L'NGF si lega ad almeno due

classi di recettori: il recettore della neurotrofina p75 NTR e il TrkA, una tirosina chinasi transmembrana, entrambi associati a disturbi neurodegenerativi. NGF si lega al recettore TrkA che dimerizza e autofosforila il suo segmento tirosina chinasi, che porta all'attivazione delle vie di segnalazione PI 3-chinasi, ras e PLC. In alternativa, il recettore p75NTR può formare un eterodimero con TrkA che ha maggiore affinità e specificità per NGF. Una delle vie di segnalazione a valle dell'NGF attiva la fosfolipasi C, rilasciando DAG e IP3 e attivando le vie associate come la proteina chinasi C. Successivamente, viene attivata la fosfatidilinositolo-3 chinasi (PI3K), con conseguente attivazione della chinasi Akt. Alcuni risultati hanno dimostrato che il blocco dell'attività PI3K o Akt provoca la morte dei neuroni simpatici in coltura, indipendentemente dalla presenza di NGF. Tuttavia, se una delle chinasi è costituzionalmente attiva, i neuroni sopravvivono anche senza NGF. Un'altra via attivata da NGF è l'attivazione mediata da ras della via della MAPK. Questo percorso viene avviato attraverso il reclutamento e l'attivazione di Shc, che porta all'attivazione di ras attraverso Grb-2 e Sos-1. La cascata della MAPK include raf, Mek ed Erk. Raf, a sua volta, attiva la cascata MAPK per facilitare l'attivazione della chinasi s6 ribosomiale (RSK) e la regolazione trascrizionale. Sia Akt sia RSK, componenti rispettivamente delle vie PI3K -Akt e MAPK, agiscono per fosforilare il fattore di trascrizione della proteina legante l'elemento di risposta dell'AMP ciclico (CREB). La famiglia di fattori di trascrizione CREB è coinvolta nella sopravvivenza dei neuroni simpatici indotta da NGF. Un ampio corpus di prove supporta l'idea che la funzione primaria dell'NGF negli adulti sia quella di mediare la risposta infiammatoria e immunitaria dopo il danno tissutale, in particolare per avviare e mantenere l'ipersensibilità, un sintomo caratteristico dell'infiammazione. Questa ipersensibilità si manifesta come una maggiore sensibilità a uno stimolo nocivo (iperalgisia) e/o la percezione di uno stimolo non nocivo come nocivo (allodinia). Un meccanismo

per spiegare questa ipersensibilità è una soglia ridotta per l'attivazione e un aumento dell'eccitabilità dei neuroni sensoriali di piccolo diametro che comunicano informazioni nocive al sistema nervoso centrale. Questo fenomeno, chiamato sensibilizzazione periferica, aumenta l'attivazione dei neuroni sensoriali di piccolo diametro e determina un aumento del rilascio del trasmettitore dai terminali periferici e centrali di questi neuroni. L'aumento del rilascio dei trasmettitori peptidici, della sostanza P (SP) e del peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP) dalle terminazioni periferiche dei neuroni sensoriali contribuisce all'infiammazione neurogena. La capacità dell'NGF di aumentare le risposte nocicettive ha ricevuto molta attenzione e ha sollevato l'idea che l'attenuazione delle azioni di questa neurotrofina potrebbe rappresentare una nuova terapia per il trattamento del dolore



cronico.

Figura 1.6: Mediazione della risposta infiammatoria da parte dell'NGF

Sul cervello l'NGF previene o riduce la degenerazione neuronale in modelli animali di malattie neurodegenerative e questi risultati incoraggianti hanno portato a numerosi studi clinici sull'uomo. È stato anche dimostrato che l'NGF promuove la rigenerazione dei nervi periferici nei ratti. L'espressione di NGF è aumentata nelle malattie infiammatorie dove

sopprime l'infiammazione. Inoltre, l'NGF sembra promuovere la riparazione della mielina e quindi può essere utile per il trattamento della sclerosi multipla. L'NGF potrebbe anche essere coinvolto in vari disturbi psichiatrici, come demenza, depressione, schizofrenia, autismo, sindrome di Rett, anoressia nervosa, bulimia e malattia di Alzheimer, in cui è stato riscontrato un aumento dell'NGF corticale e sottocorticale. L'Alzheimer è una malattia neurodegenerativa a cui è stata collegata anche la disregolazione della segnalazione dell'NGF, che causa un trasporto retrogrado alterato dell'NGF in alcune aree del cervello. Un nuovo trattamento per l'Alzheimer include la stimolazione dei recettori NGF tramite la sua infusione che ha dimostrato di aumentare il flusso sanguigno e la memoria episodica verbale. Questi miglioramenti sono durati più a lungo rispetto ad altri trattamenti per l'Alzheimer.

### **Fattore neurotrofico cerebrale (BDNF)**

Il BDNF (brain-derived neurotrophic factor) è una proteina che, nell'uomo, è codificata dal gene BDNF. Il BDNF è un membro della famiglia dei fattori di crescita delle neurotrofine, ed è stato isolato per la prima volta dal cervello di maiale nel 1982 da Yves-Alain Barde e Hans Thoenen. Da un punto di vista storico, è stato il secondo fattore neurotrofico a essere caratterizzato, dopo l'NGF. Il BDNF agisce su alcuni neuroni del sistema nervoso centrale e del sistema nervoso periferico, aiutando a sostenere la sopravvivenza dei neuroni esistenti e incoraggiando la crescita e la differenziazione di nuovi neuroni e sinapsi. Nel cervello è attivo nell'ippocampo, nella corteccia e nel prosencefalo, aree vitali per l'apprendimento, la memoria e il pensiero. Il BDNF è espresso anche nella retina, nei reni, nella prostata, nei motoneuroni, nei muscoli scheletrici e si trova anche nella saliva. Lo stesso BDNF è importante per la memoria a lungo termine. Sebbene la stragrande maggioranza dei neuroni nel cervello dei mammiferi si formi in epoca prenatale, parti del

cervello adulto mantengono la capacità di far crescere nuovi neuroni dalle cellule staminali neurali attraverso un processo noto come neurogenesi. Le neurotrofine sono proteine che aiutano a stimolare e controllare la neurogenesi, essendo il BDNF una delle più attive. I topi knock out per il BDNF presentano difetti dello sviluppo nel cervello e nel sistema nervoso sensoriale e di solito muoiono subito dopo la nascita, suggerendo che il BDNF svolga un ruolo importante nel normale sviluppo neurale. Altre importanti neurotrofine strutturalmente correlate al BDNF includono NT-3, NT-4 e NGF. Il BDNF è prodotto nel reticolo endoplasmatico e secreto dalle vescicole a nucleo denso. Si lega alla carbossipeptidasi E (CPE) e la rottura di questo legame è stata proposta come causa della perdita dello smistamento del BDNF in vescicole a nucleo denso. Il fenotipo per i topi knockout per BDNF può essere grave, inclusa la letalità postnatale: si verifica la perdita di neuroni sensoriali che influenzano la coordinazione, l'equilibrio, l'udito, il gusto e la respirazione. I topi knockout mostrano anche anomalie cerebellari e un aumento del numero di neuroni simpatici. Alcuni tipi di esercizio fisico hanno dimostrato di aumentare notevolmente la sintesi di BDNF nel cervello umano, e ciò è in parte responsabile della neurogenesi indotta dall'esercizio e dei miglioramenti nella funzione cognitiva. La niacina sembra sovraregolare anche l'espressione del recettore BDNF e della tropomiosina chinasi B (TrkB). Vari studi hanno mostrato possibili collegamenti tra BDNF e diverse condizioni patologiche, come la depressione, schizofrenia, disturbo ossessivo-compulsivo, morbo di Alzheimer, malattia di Huntington, sindrome di Rett e demenza, così come anoressia nervosa e bulimia nervosa. In uno studio sui ratti, si è visto che livelli aumentati di BDNF possono indurre una modifica a uno stato di ricompensa del tipo oppioide-dipendente, quando espressi nell'area tegmentale ventrale dell'encefalo. Ad oggi, sono note nei mammiferi quattro neurotrofine: il già citato NGF, il Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3)

e la neurotrofina-4 (NT-4). Essi sono derivati da un gene ancestrale comune e si assomigliano moltissimo nella sequenza degli aminoacidi e nella forma. Tuttavia, non è il NGF la neurotrofina più importante, bensì il BDNF. Non soltanto perchè è la più abbondante nel cervello, ma perchè può essere trasportata all'esterno del cervello attraverso la barriera emato-encefalica ed agire perifericamente. Inoltre, il BDNF è prodotto anche dalle cellule muscolari scheletriche e questo potrebbe essere un fattore di grande importanza per spiegare la frequente associazione di malattie neurodegenerative in soggetti sarcopenici. Questa neurotrofina è essenziale per la sopravvivenza neuronale durante lo sviluppo e la formazione delle reti neuronali nel cervello, regola la sinaptogenesi, la trasmissione e la plasticità sinaptica, svolgendo un ruolo cruciale soprattutto nei meccanismi di apprendimento e memoria. Uno studio preclinico ha dimostrato che il deficit cronico di BDNF porta a un deficit nell'apprendimento correlato all'età e che il BDNF è in grado di interagire con i radicali dell'ossigeno (ROS) che sono noti per essere alla base dell'invecchiamento, delle malattie neurodegenerative e di alcuni disturbi neuropsichiatrici. Pertanto, la ricerca attuale è focalizzata sulla possibilità di mettere a punto una "terapia BDNF" capace di aumentare i livelli endogeni di BDNF agendo su obiettivi molecolari mirati.

### **NT3**

È un membro della famiglia delle neurotrofine, che controlla la sopravvivenza e la differenziazione dei neuroni dei mammiferi. Questa proteina è strettamente correlata sia al fattore di crescita nervoso che al fattore neurotrofico derivato dal cervello. Può essere coinvolto nel mantenimento del sistema nervoso adulto e può influenzare lo sviluppo dei neuroni nell'embrione quando è espresso nella placenta umana. I topi con deficit di NT3 generati dal targeting genico mostrano gravi difetti di movimento degli arti.

Il peptide maturo di questa proteina è identico in tutti i mammiferi esaminati, incluso

l'uomo, maiali, ratti e topi.

### **TNF- $\alpha$**

Il Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- $\alpha$ ) o fattore di necrosi tumorale-alpha ha un ruolo importante nel processo infiammatorio, nelle malattie infettive e autoimmuni e nei tumori. Esso è responsabile di molte manifestazioni sistemiche come la febbre nel corso di patologie infettive. Il suo gene viene trascritto in risposta a stati infettivi, infiammatori e in situazione di stress cellulare. All'inizio il TNF- $\alpha$  fu identificato come quella sostanza che induceva in vivo la necrosi tumorale dopo esposizione al lipopolisaccaride. Viene prodotto da neutrofili, mastociti, eosinofili, neuroni e macrofagi. Il gene del TNF- $\alpha$  può andare incontro a una disregolazione con mancata omeostasi cellulare e un aumento di suscettibilità a malattie infettive come la tubercolosi o la malaria cerebrale. Difetti nella produzione di TNF sono implicati nell'eziopatogenesi della malattia di Alzheimer, cancro, depressione e malattie infiammatorie croniche intestinali. I fattori di trascrizione NFAT, Ets/Elk, Sp1 ed Egr giocano un ruolo fondamentale nell'espressione del gene del TNF-alfa e, una volta avvenuta la sua trascrizione e la sua traduzione, il TNF- $\alpha$  viene sintetizzato come proteina transmembrana trimerica e, poi, grazie all'enzima di conversione del TNF- $\alpha$  (TACE o ADAM17), tale proteina viene clivata con la liberazione del TNF- $\alpha$  (con peso di 17 kDa) dalla membrana cellulare al liquido interstiziale. Entrambe le forme, transmembrana e solubile, sono attive nella loro forma trimerica. Il TNF- $\alpha$  si lega a due distinti recettori di membrana, denominati TNF receptor 1 (TNFR1, CD120a, p55/p60) e TNF receptor 2 (TNFR2, CD120b, p77/p80) svolgendo in tal modo le proprie funzioni a livello cellulare. Il TNFR1 è espresso costitutivamente in quasi tutte le cellule mentre il TNFR2 è per lo più rinvenuto nelle cellule ematopoietiche e nelle cellule endoteliali in modo non costitutivo.

Il TNFR1 lega il TNF $\alpha$ , forma trimeri e induce il suo pathway di segnale dentro la cellula inducendo cascate di segnale tra cui quella di NF-kB e di alcune MAPK (JNK, p38 e ERK) che fanno esprimere i geni regolatori delle risposte immuni ed infiammatorie. L'effetto finale del TNFR1, pur essendo un potente attivatore dell'apoptosi, (in quanto recluta e attiva la caspasi 8), è determinato dall'interazione di meccanismi apoptotici ed antiapoptotici. Il TNFR1 contiene, nella sua porzione citoplasmatica, un dominio di morte (death domain, DD) essenziale per la trasduzione del segnale. Il TNFR1 si lega con il TNF- $\alpha$  e trimerizza, reclutando varie molecole: la chinasi RIP1, TRAF2 e TRAF5, TRADD e gli inibitori dell'apoptosi cIAP1 e cIAP2 e si forma un complesso di trasduzione del segnale, detto complesso I. L'apoptosi avviene grazie al complesso II che si forma grazie alla dissociazione del complesso I dalla membrana plasmatica. Il meccanismo finale consiste nell'attivazione della caspasi 8, che porta all'apoptosi. Il TNFR2 viene attivato in maniera preferenziale dalla forma transmembrana e manca del dominio di morte DD; esso sembra mediare soprattutto segnali di attivazione, proliferazione e migrazione cellulare. In ratti deficitari di TNF- $\alpha$  si è evidenziato il suo ruolo fisiologico nella struttura degli organi linfoidei secondari e nella loro funzione di difesa dell'ospite da infezioni. Un eccesso di produzione di TNF- $\alpha$  può causare sia effetti dannosi sia benefici nell'ambito delle patologie autoimmuni, ad esempio un'infiammazione multi-organo con un quadro simile a quello dell'artrite reumatoide o della sclerosi multipla. A livello sistemico la principale funzione biologica del TNF- $\alpha$  è quella di reclutare neutrofili e monociti nei siti di infezione e di attivarne le funzioni di fagocitosi con un'azione combinata tra i leucociti e le cellule endoteliali in cui vengono espresse molecole di adesione che ancorano i neutrofili e i linfociti e in cui il TNF- $\alpha$  induce la formazione di chemochine con reclutamento di leucociti. Nel corso di infezioni gravi, il TNF- $\alpha$  aumenta determinando manifestazioni cliniche sistemiche, come l'insorgenza



## **Capitolo 2**

# **Descrizione dei fattori trofici in tessuti patologici del distretto testa-collo**

In biologia, il termine fattore di crescita (spesso usato nella forma inglese growth factor) si riferisce a proteine capaci di stimolare la proliferazione, il differenziamento cellulare e di prevenire l'apoptosi. La funzione principale dei fattori di crescita è il controllo esterno del ciclo cellulare, mediante l'abbandono della quiescenza cellulare (fase G<sub>0</sub>) e l'entrata della cellula in fase G<sub>1</sub> (di crescita). Ma questa non è la loro unica funzione, infatti regolano l'entrata in mitosi, la sopravvivenza cellulare, la migrazione e il differenziamento cellulari. Insieme alla proliferazione essi promuovono sempre contemporaneamente il differenziamento e la maturazione (infatti una proliferazione senza differenziamento significa l'insorgenza di un tumore). Questi effetti sono i più disparati a seconda del fattore; ad esempio la proteina morfogenetica dell'osso (BMP) stimola il differenziamento degli osteoblasti, mentre

il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) stimola la crescita dei vasi. Questi fattori sono dunque presenti nei tessuti:

- in condizioni fisiologiche, determinandone il normale sviluppo e il loro mantenimento;
- in condizioni patologiche, determinando lo sviluppo e la progressione di varie patologie come i tumori.

Diversi studi già pubblicati hanno dimostrato la presenza dei fattori di crescita in tessuti normali e patologici a livello del distretto testa-collo.

### **Fattori trofici negli adenomi ipofisari umani**

I fattori trofici sono stati studiati in pazienti affetti da adenoma ipofisario (“Trophic and neurotrophic factors in human pituitary adenomas”, M.L. Spoletini et al 2017), tumore considerato benigno, ma in certi casi difficile da trattare in quanto soggetto a recidiva dopo la terapia standard. Alcune evidenze suggeriscono che fattori trofici e neurotrofici possono essere coinvolti nella funzionalità delle cellule endocrine ipofisarie suggerendo un loro possibile ruolo nella progressione di alcuni adenomi della ghiandola pituitaria. Le cellule ipofisarie, infatti, sono regolate attraverso l'azione di alcuni fattori di crescita e dei loro recettori, la cui differente espressione può determinare lo sviluppo e la progressione del tumore. In questo lavoro sono stati messi in evidenza vari fattori di crescita in pazienti affetti da adenomi ipofisari:

#### **NGF (Nerve Growth Factor)**

In alcuni pazienti con adenomi ipofisari è stata osservata una moderata espressione per NGF e per i suoi recettori TrKA e p75NTR nelle cellule epiteliali della ghiandola. È stato

rilevato che TrKA induce proliferazione in alcune cellule tumorali, mentre in altri tumori inibisce la crescita, e anche p75NTR ha effetto mitogeno in certi tumori mentre in altri sopprime la crescita.

### **TGF- $\beta$ (Transforming Growth Factor - $\beta$ )**

Le proteine SMADs trasducono il segnale del TGF- $\beta$ ; alcuni autori riportano che Smad3 e fosfo-Smad3 sono markers potenziali di adenoma ipofisario non funzionante invasivo. Negli adenomi non funzionanti il grado di invasività viene predetto dai livelli plasmatici dell'mRNA del TGF- $\beta$  che sono più alti nelle forme invasive. In particolare, è stato osservato che il grado di invasività dell'adenoma ipofisario non funzionante è associato con un basso livello di espressione di Smad3 e fosfo-Smad3 e che l'attività proliferativa era più alta negli adenomi ipofisari invasivi non funzionanti rispetto ai non invasivi non funzionanti. L'importanza clinica dei ligandi del TGF- $\beta$  e dei mediatori del segnale a valle è stata analizzata in alcuni studi condotti in vari tumori, ma i risultati ottenuti sono discordanti. Negli adenomi ipofisari non funzionanti l'espressione dei livelli di mRNA del TGF- $\beta$  era significativamente più bassa rispetto agli adenomi invasivi non funzionanti. Quindi è stato ipotizzato che il grado di invasività degli adenomi ipofisari potrebbe essere predetto dalle concentrazioni sieriche del TGF- $\beta$  e alcuni studi hanno ampiamente valutato il ruolo del gene del TGF- $\beta$  in alcuni tumori, tipo il cancro della mammella in cui è stata trovata una correlazione tra il gene stesso e un outcome infausto. La valutazione di un tumore in linee cellulari polmonari, ha stabilito che il gene del TGF- $\beta$ 1 svolge un ruolo importante nella proliferazione cellulare. Il TGF- $\beta$ 1 è comunemente valutato nei tumori: infatti, gli studi in vitro sono stati condotti sulla funzione del TGF- $\beta$ 1 in linee cellulari tumorali diverse dal carcinoma polmonare e dalle cellule di adenoma ipofisario. Uno studio su gatte

transgeniche ha descritto lo sviluppo di prolattinomi con espressione transgenica di TGF- $\alpha$  ipofisario.

### **CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor)**

Il CNTF è una neurotrofina con importanti effetti protettivi sui neuroni. Esso agisce legandosi al suo recettore, CNTFR, il cui mRNA è stato rilevato in adenomi secernenti PRL e Gh e in adenomi non secernenti. CNTF stimola in modo significativo sia la secrezione della PRL sia quella del GH quando le cellule presentano una struttura tridimensionale, che possiede un ruolo chiave per l'azione regolatoria del CNTF sulle cellule dell'ipofisi anteriore. L'organizzazione tridimensionale delle cellule permette una migliore espressione dei recettori.

### **GDNF (Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor)**

Il GDNF fa parte di una grande famiglia di fattori neurotrofici e ha un ruolo chiave nello sviluppo e nella sopravvivenza di varie popolazioni neuronali. Alcuni esperimenti hanno dimostrato che GDNF viene secreto normalmente nella ghiandola ipofisaria umana che inoltre rappresenta essa stessa un target per le neurotropine. Il GDNF è presente maggiormente nelle cellule somatotrope e, meno, in quelle corticotrope, mentre non è presente in quelle gonadotrope. In particolare, un'immuno-colorazione positiva per il GDNF è stata osservata in tutti gli adenomi secernenti GH e nel 10% di quelli secernenti ACTH, mentre era assente in tutti gli altri tumori ipofisari.

### **VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)**

Il VEGF è una proteina con un ruolo centrale nella regolazione dell'angiogenesi e vasculogenesi. Esso è sovraespresso nelle cellule di molti tumori vascolari umani del cervello,

tratto gastrointestinale, ovaie e mammella. Si lega ai suoi recettori VEGFR1 e VEGFR2 sull'endotelio vascolare. VEGF e VEGFR2 sono espressi nell'ipofisi e sono presenti nelle cellule adenomatose; inoltre, VEGF contribuisce alla formazione del network vascolare del neo-tumore ipofisario. VEGF è espresso in tutti i tipi di cellule dell'ipofisi ma soprattutto nelle somatotrope e in quelle follicolo-stellate, maggiormente nel tessuto sano rispetto a quello dell'adenoma. È presente anche negli adenomi non funzionanti.

### **FGFs (Fibroblast Growth Factors)**

I FGFs sono una famiglia di molecole che controllano la differenziazione, migrazione e angiogenesi delle cellule. FGF2 regola la produzione degli ormoni ipofisari e la proliferazione e differenziazione del parenchima e dei vasi. L'isoforma FGF2 di 18kDa è altamente secreta dalla ghiandola ipofisaria umana normale, mentre l'isoforma 24 kDa è largamente secreta dagli adenomi ipofisari. Gli alti livelli di FGF2 espressi da pazienti con neoplasie ipofisarie diminuivano dopo asportazione dell'adenoma. In uno studio recente si è visto che alti livelli di FGF2 sono presenti in vari tipi di tumori ipofisari inclusi gli adenomi GH secernenti. L'effetto biologico di FGF2 si esplica attraverso l'interazione con i suoi recettori FGFRs con attività tirosin-chinasica. Le multiple isoforme recettoriali sono espresse nella membrana di molte cellule incluse quelle epiteliali nelle quali FGF2 influenza lo sviluppo angiogenico. Gli FGFRs sono espressi in differenti tipi di tumore inclusi gli adenomi ipofisari, in particolare FGFR1 era altamente espresso nelle cellule del tumore (messe a confronto con le cellule ipofisarie sane) e l'immunoreattività del recettore era inversamente proporzionale con la dimensione della neoplasia. Ptd-FGFR4 è un'isoforma recettoriale con una delezione a livello dell'N terminale che determina una diversa capacità di legare le molecole di adesione: esso blocca l'adesione cellulare interagendo con il segnale dell'N-

caderina. Il complesso costituito da FGFR4 ed N-caderina è considerato un importante target terapeutico per ridurre la crescita e l'invasività delle cellule neoplastiche.

### **EGF (Epidermal Growth Factor)**

L'EGF è una piccola proteina di 6 kDa che contiene 53 aminoacidi e 3 ponti disolfuro; ha attività mitogena ed è coinvolto nel processo di crescita e divisione cellulare e nella oncogenesi. Esso viene prodotto dalle cellule dell'ipofisi e stimola la sintesi di prolattina; è localizzato principalmente nelle cellule tireotropiche e gonadotropiche ipofisarie. Uno studio immunocistochemico descrive l'espressione di EGF negli adenomi ipofisari funzionanti e non-funzionanti. È stato osservato che EGF promuove la transfosforilazione del relativo oncogene attraverso il legame con il suo recettore EGF-R, glicoproteina transmembrana di 170 kDa che presenta 3 domini: uno tirosin-chinasico, una transmembrana e uno extracellulare. Alcuni studi dimostrano una sovra-espressione di EGF-R in tumori del polmone, della mammella, dell'ovaio e dello stomaco. Onguro et al hanno descritto una positività da moderata a forte in oltre il 50% degli adenomi ipofisari, maggiore in quelli non funzionanti. Negli adenomi secernenti ACTH è stata osservata una immunoreattività bassa o assente per la proteina p27 che blocca il ciclo cellulare, facendo ipotizzare che EGF-R promuova il segnale che induce la sottoregolazione di p27 e l'oncogenesi attraverso lo stimolo della secrezione di ACTH. In conclusione possiamo affermare che alcuni studi indicano che i fattori trofici e neurotrofici, insieme ai loro recettori, possono essere coinvolti sia nel normale sviluppo della ghiandola ipofisaria sia nella progressione di alcuni adenomi ipofisari. Un'aumentata secrezione di EGF, FGF e VEGF nell'ipofisi è coinvolta nello sviluppo dell'oncogenesi, anche se ulteriori studi sono necessari per capire il ruolo biologico di questi fattori nello sviluppo e nella progressione di questi tumori. Le proteine trasduttori

di segnale TGF- $\beta$  sono Smad e i complessi recettoriali TGF- $\beta$  attivati possono fosforilare Smad2 e Smad3. Alcuni autori hanno riferito che Smad3 e phospho-Smad3 sono potenziali marcatori di adenomi ipofisari invasivi non funzionanti.

## **Fattori trofici nei gliomi cerebrali**

La presenza di fattori di crescita è stata documentata con l'immunoistochimica anche nei gliomi cerebrali ("Brain gliomas and growth factors: immunohistochemical, immunofluorescence, flow cytometry and RT-PCR profile in pediatric age" S. Taurone et al 2019). I gliomi rappresentano oltre il 50% dei tumori che si verificano nei bambini e nei giovani adulti. L'evidenza suggerisce che le cellule staminali del glioma (GSC), mantenute dalla via del fattore di crescita trasformante beta (TGF- $\beta$ 1), e la vascolarizzazione contribuiscono sostanzialmente all'aggressività del tumore e alla sua resistenza alla terapia. L'identificazione di importanti fattori angiogenici come il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), il recettore del fattore di crescita dell'epidermide (EGFR) e il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) può rappresentare un passaggio cruciale nell'approccio terapeutico contro la crescita tumorale e la diffusione metastatica del tumore. In questo studio è stata identificata l'espressione del TGF- $\beta$ 1, VEGF e VEGF-R coinvolti nel processo infiammatorio e angiogenetico dei gliomi cerebrali. È stata eseguita l'analisi immunoistochimica e lo studio dell'espressione genica dei campioni. La massa del glioma era costituita da un'area periferica caratterizzata da tipi cellulari con un più alto grado di differenziazione che esprimono fattori pro-angiogenici. I gliomi di nuova diagnosi hanno mostrato principalmente un'immunocolorazione marrone del VEGF da moderata a forte nel citoplasma e una maggiore espressione di molecole pro-infiammatorie, incluso il TGF-beta1. La proporzione di cellule endoteliali positive per TGF- $\beta$ 1 era notevolmente inferiore

nei vasi cerebrali normali rispetto ai vasi tumorali. L'immunocolorazione del TGF- $\beta$ 1 era localizzata sulla superficie cellulare e nel citoplasma. Il TGF- $\beta$ 1 rappresenta un fattore prognostico negativo per il glioma ed è strettamente coinvolto nell'angiogenesi e nella regolazione del VEGF-RII. Un'alta espressione di TGF- $\beta$ 1 mostrava una stretta correlazione con una marcata espressione di VEGF-RII nelle cellule tumorali. L'espressione del VEGF-RII e l'attività del TGF- $\beta$ 1 possono essere associate con gli aspetti clinico-patologici del glioblastoma umano. Nei campioni analizzati è stato dimostrato che la maggioranza dei vasi sanguigni del cervello normale è sprovvista di VEGF-RII che invece è presente a livello del tumore. Il VEGF-A mostra intensa immuno-colorazione a livello del citoplasma; esso aumenta la permeabilità microvascolare e promuove l'angiogenesi. VEGF-A era aumentato in modo significativo nei glioblastomi con alta espressione di VEGF-RII e TGF- $\beta$ 1. L'immunocolorazione per il VEGF-RII a livello dei microvasi si osservava facilmente nei gliomi ad alto grado. L'immunocolorazione per VEGF-RI era confinata al citoplasma delle cellule gliali; essa appariva debolmente espressa nei corpi dei neuroni e nelle cellule dell'astroglia ed era francamente negativa nelle cellule gliali del tessuto cerebrale normale. Il segnale del VEGF-RII è coinvolto nella proliferazione delle cellule staminali del glioblastoma. I dati dello studio dimostrano che VEGF era sovraespresso nel tessuto neoplastico con la massima espressione nei tumori di IV grado. VEGF sostiene la crescita del tumore promuovendo la neovascolarizzazione, ed è, probabilmente, il più importante fattore di derivazione endoteliale nel regolare la proliferazione delle cellule staminali del glioblastoma (GBSC). VEGF stimola la proliferazione delle GBSC attraverso VEGF-RII. Il TGF- $\beta$ 1 è un regolatore iniziale dei fattori angiogenici come il VEGF e una sua elevata espressione nel glioblastoma stimola la neo-vascolarizzazione. Una sovraespressione di TGF- $\beta$ 1 determina una sovraregolazione di VEGF-A e VEGF-RII attivando la via PI3K/AKT in condizione

di ipossia.

## **Fattori di crescita nei meningiomi e nei tessuti normali della dura madre**

I fattori di crescita sono stati studiati in un altro lavoro (“Immunohistochemical profile of neurotrophins in human cranial dura mater and meningiomas” M. Artico et al. 2009). Gli studi immunohistochimici hanno dimostrato immunoreattività per le neurotrofine e i loro recettori sia a livello della dura madre normale sia nel tessuto durale vicino all'area del meningioma. Le sezioni raccolte dalla dura madre normale in genere dimostravano una marcata reattività a livello dell'endotelio dei vasi, nelle fibre collagene e nei fibroblasti. L'immunoreattività per NGF era chiaramente dimostrata nei fibroblasti e nelle fibre collagene e appariva dello stesso grado nell'endotelio vasale durale. L'immunocolorazione per NGF nel meningioma transizionale è più evidente negli aggregati di macrofagi e nei fibroblasti. Allo stesso modo l'immunoreattività per TrKA era fortemente presente nell'endotelio dei vasi durali, nei fibroblasti e nelle fibre collagene nel meningioma meningoteliosomatoso-psammomatoso, e nel tessuto durale circostante. Una moderata immunoreattività per il p75NTR fu dimostrata nella dura madre normale e in un meningioma transizionale nell'endotelio dei vasi durali, mentre era debole nei fibroblasti, nei macrofagi e nelle fibre collagene. Immunoreattività per BDNF era apprezzabile nella dura madre umana normale e nel meningioma meningoteliosomatoso-psammomatoso/tessuto durale circostante nella parete dei vasi durali, nei fibroblasti e nelle fibre collagene e negli stessi compartimenti era presente una reazione per TrKB e una moderata immunoreattività per NT-3 e per NT-4. Nelle stesse aree era apprezzabile anche immunoreattività per TrKC.

Le sezioni del meningioma mostravano un'alterazione strutturale delle fibre collagene con

fibroblasti compressi dentro spirali ben circoscritte che rimpiazzavano completamente la struttura normale della dura madre. E' stata anche osservata una reattività evidente nella parete dei vasi durali, negli aggregati di fibroblasti/macrofagi e nelle aree vorticoidi che potrebbero calcificare in alcuni istotipi formando così delle strutture laminari concentriche chiamate corpi psammomatosi. Gli aggregati di macrofagi mostravano una forte immunoreattività per NGF e TrKA, mentre veniva dimostrata una reazione moderata per l'endotelio vasale; l'immunoreattività per p75NTR era al contrario debole negli stessi compartimenti. Nelle aree vorticoidi le cellule neoplastiche mostravano una notevole immunoreattività per BDNF e TrKB confermando così il loro ruolo fondamentale nell'aumentato tasso di proliferazione delle lesioni neoplastiche. La reattività per NT3 e NT4 era moderata nelle cellule neoplastiche delle aree vorticoidi, nella parete dei vasi durali e negli aggregati di macrofagi. Un risultato simile fu osservato per TrKC e p75.

## **Fattori trofici nello schwannoma vestibolare**

I fattori trofici sono stati inoltre documentati nello schwannoma vestibolare e nel tessuto del nervo vestibolare sano ("Immunoistochemical profile of cytokines and growth factors expressed in vestibular nerve tissue" S. Taurone et al.2015). È stata fatta un'analisi immunostochimica di campioni di nervo vestibolare sano umano e campioni di schwannoma. Tutti i campioni di VS (Vestibular Schwannoma) esaminati nel presente studio hanno mostrato una marcata immunoreattività per TGF- $\beta$ 1 che è stata rilevata principalmente nel citoplasma delle cellule di Schwann mostrando differenze nel numero di cellule immunopositive tra i tipi di tessuto Antoni A e Antoni B che rappresentano modelli architettonici istologici distinti che aiutano nella diagnosi istopatologica dello schwannoma. Il tessuto di tipo A è altamente cellulare e dimostra la palizzata nucleare e i corpi di Verocay associati, che

riflettono la loro matrice extracellulare e la secrezione di laminina. Il tessuto di tipo B è vagamente organizzato con cambiamento mixomatoso e cistico e può rappresentare un tessuto Antoni A degenerato. Le aree cellulari di Antoni A hanno espresso un'immunoreattività TGF- $\beta$ 1 più prominente rispetto alle aree di Antoni B. Le regioni Antoni B mostravano aree cellulari meno dense rispetto alle regioni Antoni A, in cui c'erano cellule del fuso disposte in modo compatto con nuclei lunghi e ovali. La reattività del TGF- $\beta$ 1 è stata dimostrata anche nelle pareti dei vasi sanguigni distribuite nel tessuto connettivo denso neoplastico. Non è stata osservata immunoreattività per TGF- $\beta$ 1 nelle cellule endoteliali vascolari o nelle aree Antoni A e Antoni B nei campioni di controllo. Il TNF- $\alpha$  è stato debolmente espresso dalla maggior parte dei campioni di VS umani nelle cellule endoteliali dei vasi e nelle regioni Antoni A e Antoni B. Numerosi nuclei immunopositivi sono stati rilevati nelle regioni Antoni A rispetto alle regioni Antoni B. Nessuna immunoreattività per TNF- $\alpha$  è stata rilevata nei campioni di nervo vestibolare di controllo sano. C'è stata una maggiore espressione di IL1- $\beta$  all'interno dei tessuti VS, che è stata localizzata nel citoplasma delle cellule di Schwann. Le regioni Antoni A e B hanno mostrato approssimativamente lo stesso numero di nuclei immunopositivi per IL1- $\beta$ . Un'espressione moderata per IL1- $\beta$  è stata osservata anche nei vasi sanguigni. Non è stata osservata alcuna colorazione nei tessuti di controllo. L'immunoistochimica per IL-6 è risultata positiva nelle cellule VS, con debole espressione nel citoplasma, mentre nei campioni di nervi di controllo non era rilevabile. I risultati hanno confermato che queste citochine sono coinvolte nello sviluppo e nella progressione della VS attraverso la stimolazione della proliferazione cellulare di Schwann. Le citochine proinfiammatorie, tra cui TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IL-6, possono essere secrete da leucociti attivati, fibroblasti e cellule di Schwann. Queste citochine sono note per indurre l'espressione di molecole di adesione, come ICAM-1 e VCAM-1, e sono

in grado di facilitare l'attaccamento dei leucociti e le interazioni con le cellule del tessuto trigger, un'area del neurone che contiene un'alta concentrazione di membrana di canali Na<sup>+</sup> voltaggio-dipendenti. Un'espressione significativamente più alta di ICAM-1 è stata osservata nel citoplasma delle cellule di Schwann, rispetto ai campioni di nervo di controllo, in cui non è stata identificata alcuna colorazione. La colorazione immunostochimica per VEGF è risultata positiva in 9/10 dei casi di VS. Un'espressione positiva di VEGF è stata osservata nei campioni tumorali. Il VEGF ha mostrato colorazione citoplasmatica finemente granulare nelle cellule di Schwann con colorazione focale intensificata nella regione perinucleare. C'era solo una piccola variazione di colorazione all'interno dei tessuti dei singoli tumori. La colorazione per VEGF si è verificata anche nel citoplasma delle cellule endoteliali e nei leucociti polimorfonucleati all'interno dei vasi. Questi dati confermano che il VEGF può avere un impatto significativo sui VS di crescita, stimolando l'attività mitogenica delle cellule di Schwann e l'angiogenesi in questi tumori. L'immunoreattività del VEGF è stata assente nei campioni di nervo di controllo.

## **I fattori trofici nella tonsilla linguale umana**

In un altro studio sono stati dimostrati i fattori trofici nelle tonsille (Neurotrophins and their receptors in human lingual tonsil: an immunohistochemical analysis; M. Artico et al.2008). Gli organi linfoidi sono forniti di molte terminazioni nervose associate a diversi tipi di cellule e macrofagi. Il ruolo di questi neuromediatrici sul rilascio di molecole localmente attive è ancora sconosciuto. Qui è stata focalizzata l'attenzione sull'espressione di alcune neurotrofine (NT), dei loro recettori ad alta e bassa affinità e di diversi neurotrasmettitori nelle tonsille umane.

L'immunostochimica al microscopio ottico ed elettronico ha mostrato che i campioni ton-

sillari umani erano positivi per tutte le neurotrofine analizzate (NGF, BDNF e NT-3) e i loro recettori ad alta affinità (TrkA, TrkB e TrkC, rispettivamente). Tutte queste molecole sono state fortemente espresse nei macrofagi mentre, in alcuni pazienti, è stata riscontrata anche una colorazione specifica più debole nei linfociti e nei vasi sanguigni. Il recettore a bassa affinità per NGF (p75) era sempre assente nei campioni analizzati. La RT-PCR ha confermato la presenza di trascritti specifici per le NT e i loro recettori ad alta affinità, nonché l'assenza di mRNA per la proteina p75. Inoltre, l'immunoreattività specifica per i neurotrasmettitori SP, VIP, CGRP, ChAT e nNOS è stata espressa principalmente dalle cellule macrofagiche. Questi risultati suggeriscono la presenza di una vasta rete di innervazione nelle tonsille palatine umane che può svolgere un ruolo nella regolazione di alcune funzioni immunitarie e nella modulazione di un possibile scenario funzionale di interazioni tra diversi sottotipi di cellule immunitarie.

### **Fattori trofici nei paragangliomi giugulo-timpanici**

I fattori trofici sono stati studiati anche nei paragangliomi giugulo-timpanici (Immunohistochemical profile of neurotrophins and mib-1 in jugulotympanic paragangliomas: prognostic value and review of the literature- M. Artico e al.). In questo studio è stata analizzata con l'immunoistochimica l'espressione delle neurotrofine, dei loro recettori e MIB-I in 15 campioni di paragangliomi nell'ottica di considerarli come fattori prognostici di malignità. E' stata osservata una generale positività per NGF, TrkA, NT4 e TrkC nel citoplasma e una forte espressione per BDNF nello spazio extracellulare. MIB-I era moderatamente espresso nel nucleo delle cellule neoplastiche, debolmente nel citoplasma e totalmente assente nello spazio extracellulare. Nei pazienti con recidiva di malattia c'era una forte immunoreattività per le neurotrofine citoplasmatiche portando ad ipotizzare il

loro coinvolgimento nella proliferazione delle cellule del glomo; possiamo affermare che le neurotrofine e i loro recettori possono essere considerati come potenziali markers diagnostici per monitorare lo sviluppo di tali patologie mentre MIB-I non sembra essere un chiaro marker prognostico delle forme maligne di questi rari tumori. Comunque, il numero esiguo di pazienti non permette di arrivare a conclusioni definitive, richiedendo ulteriori studi. L'immunoistochimica ha mostrato una risposta rilevante per NGF a livello citoplasmatico, mentre essa era moderata a livello del nucleo. L'immunoreattività per TrKA era alta in modo significativo nei compartimenti nucleare e citoplasmatico della cellula, mentre era moderata nello spazio extracellulare. L'immunoreattività per p75NTR era scarsamente apprezzabile nelle cellule neoplastiche e nel compartimento extracellulare. BDNF mostrava una forte espressione nel compartimento extracellulare mentre era debole nelle cellule del tumore. TrKB aveva un'alta espressione nel citoplasma delle cellule neoplastiche, mentre essa era moderata nel nucleo. MIB-I era apprezzabile nel nucleo delle cellule tumorali, mentre era totalmente assente nello spazio extracellulare. NT-3 era apprezzabile solo nel citoplasma ma non nello spazio extracellulare. NT-4 mostrava una forte immunoreattività a livello del citoplasma delle cellule neoplastiche e un'espressione moderata nel nucleo. L'immunoreattività per TrKC era fortemente presente nel compartimento citoplasmatico e moderatamente nello spazio extracellulare. Comunque, tutti i pazienti affetti da paraganglioma giugulo-timpanico presentavano una forte immunoreattività per le neurotrofine, che era maggiore nei tumori recidivanti, mentre nessuno dei casi non recidivanti aveva questa ampia distribuzione delle neurotrofine. Questo porta ad ipotizzare il coinvolgimento di queste sostanze nella proliferazione cellulare dei tumori del glomo.

## Capitolo 3

### Scopo dello studio

Obiettivo principale del nostro studio sperimentale è stato la valutazione in numerosi campioni di tessuti di mucosa nasofaringea, ottenuti in seguito ad asportazione chirurgica da pazienti affetti da angiofibroma nasofaringeo, del diverso pattern di espressione dei fattori di crescita TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  e VEGF rispetto al tessuto normale di controllo. Abbiamo deciso di valutare l'espressione di tali fattori per verificare l'esistenza di un'eventuale correlazione di essi con la progressione della malattia. L'identificazione di questi fattori di crescita è fondamentale per stabilire il loro coinvolgimento nell'insorgenza della malattia, al fine di comprenderne la fisiopatologia, utile allo sviluppo di terapie innovative che possano migliorare la qualità di vita dei pazienti. La comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari che portano allo sviluppo dell'angiofibroma potrebbe infatti aprire la strada allo sviluppo di nuovi approcci terapeutici atti a prevenire l'insorgenza della malattia al fine di evitare trattamenti chirurgici altamente invasivi.

## **L'angiofibroma nasofaringeo giovanile (JNA)**

L'angiofibroma nasofaringeo è un tumore fibrovascolare benigno, raro, localmente aggressivo, che origina dalla parete posterolaterale del rinofaringe, interessando prevalentemente maschi durante la tarda infanzia e l'adolescenza (la malattia esordisce di solito tra i 7 e i 19 anni) e si presenta sotto forma di massa nella cavità nasale e nel rinofaringe, provocando ostruzione nasale, epistassi, edema facciale importante, proptosi, diplopia. Sebbene la progressione sia lenta, la malattia presenta un elevato tasso di recidive e talvolta invade le strutture adiacenti. Comprende circa il 5% di tutti i tumori della testa e del collo. Suggeriva è l'origine del tumore dallo stroma fibrovascolare in cui i vasi sono ricchi di endotelio e poveri di tunica muscolare. La sintomatologia è caratterizzata da ostruzione nasale (monolaterale nelle fasi iniziali), severe epistassi recidivanti, rinorrea purulenta, deformità facciali e rinolalia chiusa.

### **Epidemiologia**

In Europa e nei paesi anglosassoni il tumore è di riscontro infrequente (1/6000 - 1/16000 dei pazienti sottoposti a visita O.R.L. ) mentre la sua incidenza è più elevata in Egitto, India, Sud-Est asiatico, Kenia e Messico. L'inizio dei sintomi e dei segni generalmente varia dai 7 ai 21 anni con una media dai 14 ai 18 a seconda delle casistiche.

### **Patogenesi**

L'origine e lo sviluppo della JNA non sono completamente compresi. Il dibattito attuale coinvolge le teorie dell'amartoma e della malformazione vascolare. I casi occasionali sono noti per regredire come gli amartomi. L'origine istologica della JNA coinvolge cellule endoteliali vascolari e i fibroblasti. Si discute anche se entrambi i componenti proliferano e

crescono insieme o se un componente è responsabile della crescita e l'altro semplicemente uno spettatore. Recenti studi immunoistochimici e genetici gettano un po' di luce su questo argomento. Gli sforzi per determinare la patogenesi del tumore sono stati fatti studiando l'espressione di vari fattori di crescita e oncogeni come C-KIT e C-MYC. Una colorazione immunitaria significativamente più elevata con CD34, fattore di crescita endoteliale vascolare, flt-1 e flk-1 nel JNF, rispetto agli emangiomi cavernosi orbitali, indica la sua natura vasoproliferativa. Ciò supporta l'ipotesi che le cellule endoteliali vascolari possano diventare cellule mesenchimali indifferenziate postembrionali e possano essere indotte in altri fenotipi mesenchimali non emopoietici. Il gene GSTM1 è stato implicato nella formazione di JNA. La perdita di espressione di GSTM1 (genotipo nullo) è osservata in questo tumore. La selettività sessuale del JNA e l'età relativamente giovane alla diagnosi suggeriscono che il suo sviluppo è ormone-dipendente. Diversi autori hanno studiato i recettori degli androgeni (AR), recettori del progesterone e recettori degli estrogeni (ER) in JNA con discrepanze nei risultati. Queste discrepanze possono essere dovute agli anticorpi monoclonali che rilevano solo alfa-ER e non la proteina beta ER. Nonostante le segnalazioni di disturbi ormonali nei pazienti con JNA e la presenza di AR e/o ER nei tessuti tumorali, non si osservano alterazioni apparenti dei livelli ormonali sierici. L'influenza ormonale in JNA rimane controversa.

### **Anatomia Patologica**

L'istopatologia rivela uno stroma fibrocellulare con cellule fusiformi e disposizione casuale di collagene intervallato con un pattern vascolare irregolare. I vasi sanguigni sono a fessura o dilatati, organizzati in gruppi e sono di diversi calibri. Si nota una maggiore densità verso la periferia; si vede un tipico aspetto di tipo staghorn. La mitosi è rara. Beham et

al. nel 1997 hanno dimostrato che le cellule fusiformi del JNA sono fibroblasti e non miofibroblasti. Tuttavia, le aree mixoidi possono essere viste intervallate all'interno del tumore (anche se in certi casi sono assenti). Infine, si vedono numerose cellule infiammatorie come mastociti e linfociti T. Macroscopicamente l'JNA viene generalmente descritto come una massa di colorito variabile dal rosa-grigio al rosso porpureo, lobulato, di consistenza gommosa. Il tumore, istologicamente benigno, presenta una componente cellulare costituita da fibrociti di forma sottile o stellata immersa in una matrice connettivale variamente rappresentata. La componente vascolare è costituita da vasi capillari e da ampie lacune ripiene di sangue, rivestite soltanto da cellule endoteliali. La componente stromale è invece costituita da elementi cellulari di tipo fibroblastico in grado di produrre fibre collagene. Spesso individuabili anche cellule muscolari od elementi di transizione tra i due istotipi; è questo riscontro istologico che ha portato alcuni autori ad ipotizzare un'ipotetica trasformazione delle cellule endoteliali vasali in elementi cellulari stromali.

### **Storia naturale del tumore**

La sede tissutale di origine della neoplasia è tuttora incerta e molte delle passate teorie rivestono ora solamente un significato storico. Suggestiva è l'origine del tumore dallo stroma fibrovascolare normalmente presente nelle cavità nasali e nel rinofaringe. Il JNA generalmente nasce sulla parete postero-laterale della cavità nasale dove il processo sfenoidale dell'osso palatino incontra l'ala orizzontale del vomere ed il processo pterigoideo. Questo forma il contorno superiore del forame sfeno-palatino e la porzione finale del turbinato medio. Da qui il tumore si diffonde, sfruttando le vie di minor resistenza, andando ad occupare il nasofaringe, lo sfenoide, la fossa pterigomascellare ed infratemporale. A causa di eventuali punti di attacco secondari, di apporti vascolari supplementari e della capacità

di diffusione, è erroneo restringere il sito di origine al nasofaringe. In un considerevole numero di casi il tumore, al momento della diagnosi, ha già un'estensione nelle regioni paranasali, che comprendono oltre ai seni paranasali maggiori e minori anche orbita, spazi retroantrali ed intracranici. Una sommaria descrizione della storia naturale del tumore prevede una fase di crescita iniziale al di sotto della mucosa appena all'interno del margine coanale posteriore, a livello della porzione laterale del tetto del rinofaringe. L'evoluzione successiva prevede una diffusione sottomucosa, lungo il tetto, fino a raggiungere il bordo posteriore del setto nasale e poi verso il basso formando una massa che dal tetto si sporge nella cavità nasale posteriore. Questa viene ad essere progressivamente stipata dalla massa che erode il setto nasale e comprime il turbinato medio. E' stato osservato come spesso il tumore non entri nel seno mascellare attraverso la parete laterale del naso ma esca dalla coana posteriore, dislocchi il palato molle e possa rendersi visibile al di sotto del margine libero. La crescita laterale avviene attraverso il forame sfeno-palatino: una volta raggiunta la fossa pterigo-mascellare il tumore comprime il tessuto osseo circostante e distrugge il tetto del processo pterigoideo dell'osso sfenoidale. Il gonfiore della guancia che è spesso un segno clinico che accompagna il JNA, è prodotto dall'estensione del tumore nella fossa infra-temporale e dall'espansione della fessura pterigo-mascellare. Se il tumore è sufficientemente ampio può espandersi nella parte bassa della fossa infra-temporale producendo una protuberanza al di sopra dello zigomo. Seguendo questo, può entrare nella fessura orbitale inferiore e successivamente raggiungere la porzione bassa della fessura orbitale superiore. A questo punto il tumore distrugge la grande ala dello sfenoide e la base del processo pterigoideo portandosi così a ridosso della dura madre della fossa cranica media anteriormente al forame lacero e lateralmente al seno cavernoso. Estensioni superiori sono possibili quando il tumore cresce dal suo punto di origine verso il pavimento del seno

sfenoidale, riempiendolo completamente sino a raggiungere eventualmente la sella turcica. Quindi il tumore può raggiungere la cavità cranica o attraverso la fossa cranica media, anteriormente al forame lacero e lateralmente al seno cavernoso ed alla carotide interna o attraverso la sella turcica, medialmente alla carotide interna e lateralmente alla ghiandola pituitaria. Per una lesione ancora non univocamente definita come neoplastica presenta manifestazioni di elevata aggressività biologica.

### **Quadro clinico**

La sintomatologia clinica comprende:

- ostruzione nasale (monolaterale nelle fasi iniziali);
- severe epistassi recidivanti;
- rinorrea purulenta;
- deformità facciali;
- rinolalia chiusa posteriore.

Generalmente la progressione dei sintomi avviene con questa successione: ostruzione nasale, epistassi ricorrenti monolaterali, progressiva deformità del palato, faccia e collo, rinolalia ed anosmia. Spesso, comunque, severe epistassi rappresentano il primo sintomo clinico mentre raramente questo dipende da localizzazioni extra naso-faringee della malattia. Di pari passo con la crescita progressiva del tumore possono rendersi evidenti alcuni segni clinici dipendenti dall'azione compressiva della neoplasia quali l'esoftalmo, l'otite sieromucosa e l'ostruzione del dotto naso-lacrimale.

## **Indagini pre-operatorie**

I principali scopi delle indagini preoperatorie sono:

- confermare la diagnosi clinica;
- selezionare l'approccio chirurgico ottimale;
- prepararsi ad ottenere la minor perdita ematica intra-operatoria.

Per selezionare l'approccio chirurgico più corretto al fine di ottenere una rimozione totale del tumore è necessaria una precisa stadiazione del medesimo. Si usa l'endoscopia nasale e l'imaging TC e RM per definire l'esatta localizzazione del tumore nonché la sua estensione e la relazione con strutture vascolari e nervose importanti. L'angiografia carotidea viene eseguita entro alcuni giorni dall'intervento per identificare la principale fonte di apporto vascolare del tumore ed embolizzare i vasi di nutrimento, originanti principalmente dal sistema della carotide esterna; ci informa, inoltre sulla mono o bilateralità dell'apporto nutritivo vascolare. Proprio l'angiografia a sottrazione di immagini ha dimostrato che la principale fonte vascolare di nutrizione della maggior parte dei fibroangiomi è rappresentata da un'arteria mascellare interna particolarmente slargata; talvolta l'apporto sanguigno afferisce addirittura da entrambi i lati. Arterie supplementari sono state identificate nelle branche durali, sfenoidali ed oftalmiche della carotide interna, nelle vertebrali ed nel tronco tireo-cervicale. Rimane di fondamentale importanza il ruolo delle altre tecniche di imaging quali la TC con tagli in sezione assiale e coronale per meglio studiare i dettagli ossei (patognomonico è l'erosione "bowing" della parete posteriore del seno mascellare) e soprattutto la RM con gadolinium enhancement, dirimente nel valutare l'estensione extra-nasale e soprattutto intra-cranica del tumore. Molti casi di JNA non richiedono esame bioptico prima della definitiva resezione. Nonostante l'aspetto radiografico per lo più

caratteristico, non esistono segni sicuri di JNA. Pertanto, se l'aspetto del tumore appare atipico e la storia clinica è inusuale si ricorre ad un esame istologico pre-operatorio. Quando necessario l'esame bioptico va comunque eseguito in sala operatoria poiché significative emorragie potrebbero richiedere un tamponamento nasale antero-posteriore o addirittura la chiusura di un vaso arterioso maggiore. Se in base all'imaging preoperatorio esiste un rischio significativo di lesione della carotide interna, può essere effettuato un test di occlusione del vaso al fine di accertare l'esistenza di un circolo collaterale in caso di sacrificio del tronco arterioso maggiore.

### **Terapia**

L'arteriografia seguita da embolizzazione preoperatoria e resezione chirurgica rappresentano il trattamento di scelta. Nonostante le molte discussioni da lunga data effettuate in merito alla possibile "regressione spontanea" dell'JNA, in considerazione dell'evoluzione progressivamente sclerotizzante della lesione, pochi autori hanno effettivamente descritto tale fenomeno. In merito all'ormonoterapia: il trattamento con il testosterone è stato il primo ad essere utilizzato, ma è oggi ritenuto pericoloso per le alterazioni dello sviluppo ed i suoi gravi effetti collaterali. Non viene considerato quindi una valida opzione terapeutica neanche in aggiunta ad altri trattamenti. Alcuni centri utilizzano invece basse dosi di estrogeni (Stilbestrolo). Questi possono indurre problemi mammari, ma hanno in genere effetti limitati nel lungo periodo. L'utilizzo elettivo degli estrogeni viene limitato ad un'azione di riduzione della massa e della vascolarizzazione tumorale che meglio faciliti la successiva aggressione chirurgica. La Radioterapia non viene utilizzata come forma elettiva di trattamento. Le indicazioni comprendono: tumori che interessino strutture vitali come il seno cavernoso o i nervi ottici o che producano estese invasioni intracraniche (con relativa elevata

morbilità chirurgica) e in caso di recidive post-chirurgiche. In genere viene utilizzato un dosaggio complessivo di 3000 Gy frazionato in un periodo di 3 settimane che sfrutta la modesta radio-sensibilità della componente vascolare e sembra indurre sclerosi ed atrofia della componente stromale. Sebbene possa produrre una temporanea riduzione della massa tumorale, la transitorietà di tale azione, la morbilità ad essa collegata ed il pericolo di un'induzione sarcomatosa a lungo tempo, pongono questo trattamento sempre, quando indicato, in aggiunta ad altri presidi terapeutici. Le principali complicanze sono: deficit di sviluppo delle ossa del massiccio facciale, radionecrosi dei tessuti molli, osteomieliti, danni oculari quali cataratta e xerostomia, deficit di secrezione ipofisaria.

## **Chirurgia**

Rappresenta il gold-standard del trattamento del JNA tranne nei casi inoperabili per l'eccessiva estensione del tumore. Lo scopo della chirurgia è la completa exeresi tumorale con la minima perdita di sangue e morbilità. A causa della diffusione sottomucosa, dell'assenza di una vera capsula del tumore, della complessità anatomica delle regioni coinvolte e delle possibili emorragie che possono oscurare il campo operatorio, una resezione completa richiede un'ottima esposizione chirurgica con diretta visualizzazione sia della massa sia dell'intero letto tumorale. L'approccio chirurgico va quindi selezionato in base a:

- localizzazione ed estensione del tumore;
- vascolarizzazione del tumore ed efficacia dell' embolizzazione;
- età del paziente;
- esperienza del team chirurgico.

Le principali tecniche chirurgiche adottate per il trattamento dell'JNA sono:

- Resezione trans-nasale endoscopica;
- Resezione transfacciale;
- Approccio attraverso la fossa infra-temporale.

## **Capitolo 4**

# **Materiali e Metodi**

### **Pazienti**

Abbiamo analizzato campioni relativi a:

- 16 pazienti patologici, di età compresa tra 12 e 22 anni, 9 maschi e 7 femmine, sottoposti ad intervento chirurgico per rimozione di angiofibroma nasofaringeo (tessuto connettivo del nasofaringe) presso il Policlinico Umberto I;
- 6 campioni controllo, 4 maschi e 2 femmine di età compresa tra 14 e 25 anni.

### **Preparazione delle sezioni istologiche in paraffina**

I campioni, dopo essere stati prelevati, devono subire una serie di processi che hanno come scopo unitario la conservazione e la corretta visione del tessuto al microscopio. Il processo di inclusione in paraffina prevede un primo step definito “Processazione” dei campioni istologici che consente di ottenere l’infiltrazione totale dei tessuti da parte di un mezzo di inclusione. Quest’ultimo è una sostanza che penetrando nei tessuti completamente

conferisce loro una consistenza uniforme idonea al sezionamento. Inoltre, si può affermare che i tessuti correttamente inclusi possono conservarsi per lunghissimo tempo. Tre sono le tappe fondamentali della Processazione:

- Disidratazione;
- Chiarificazione;
- Infiltrazione.

Il primo passaggio può essere effettuato attraverso l'utilizzo di: Alcool, Acetone o con altre miscele organiche (alcooli alifatici, etanolo, Alchile C5C12). L'alcool etilico viene utilizzato mediante passaggi scalari crescenti a partire dalle diluizioni in H<sub>2</sub>O del 50% - 70% fino all'etilico assoluto (anidro). Può essere utilizzato anche l'alcool etilico denaturato; in questo caso bisogna assicurarsi della purezza del reagente e si potrà inoltre osservare una colorazione rosata dei campioni. Per quanto riguarda il processo di chiarificazione, questo è una tappa importante anche se non sempre indispensabile. Nell'inclusione in paraffina, la disidratazione in alcool ha lo scopo di fare da ponte tra l'alcool e la paraffina che non sono miscibili tra loro. Le sostanze chiarificanti o diafanizzanti sono così chiamate perché i tessuti quando vengono immersi in queste soluzioni acquistano un aspetto "brillante", "traslucido". Tra le sostanze chiarificanti troviamo: Xilene o Xilolo, Benzene, Toluene, Cloroformio e infine l'Olio di legno di cedro. Il processo di inclusione prevede l'utilizzo di diversi mezzi di inclusione, così chiamati per il ruolo che svolgono nel processo, tra i più utilizzati ricordiamo:

- Paraffina;
- Celloidina;

- Sostanze Idrosolubili;
- Metacrilati;
- Resine epossidiche.

Le Paraffine, il mezzo di inclusione più diffuso e usato, sono una miscela di idrocarburi saturi di elevato peso molecolare che fondono a temperature di 50°- 65°C e sono solidi a T° ambiente, insolubili in acqua e alcool. Indispensabile quindi la disidratazione e la chiarificazione (xilene, cloroformio, benzolo ecc.). Mentre per quanto riguarda gli altri mezzi di inclusione, meno usati, vengono utilizzati secondo le proprie caratteristiche chimico-fisiche della sostanza e del campione come la celloidina, una miscela di di-tri-tetranitrocellulosa. Risulta utile per grosse inclusioni o tessuti particolarmente duri e quando è necessario trattare i tessuti a T° ambiente. I tessuti devono essere lasciati in alcool tempi di inclusione molto lunghi e complessi. Tra le sostanze idrosolubili abbiamo per esempio la gelatina, la quale richiede elevate temperature e il carbowax, formato da glicole polietilenico solubile in acqua. I metacrilati, invece, vengono utilizzati principalmente per la M.E. o per tessuti duri, e sono sostanze permeabili all'acqua. Alcuni metacrilati richiedono per la polimerizzazione di acceleratori, calore, assenza di aria o raggi U.V. In realtà, vengono usate maggiormente le resine epossidiche per includere campioni di M.E. o membrana esterna. Sono composti da miscele di 3 o 4 componenti:

- Epossidi (come Epon e Araldite);
- Induritori;
- Catalizzatori.

Sono strutturalmente dei polimeri termoindurenti contenenti, nel precursore liquido, l'anello epossidico a tre atomi. Le resine epossidiche sono vetrose a temperatura ambiente e vengono quindi miscelate con diluenti (stirene) per abbassare la viscosità a livelli adeguati all'impregnazione delle fibre. Generalmente si presentano sotto forma di di-epossido; si tratta di una catena lineare di molecole alla cui estremità trovano posto i gruppi epossidici (CH<sub>2</sub>-O-CH) con i quali reagiscono gli agenti leganti durante la polimerizzazione. I gruppi ad anello contribuiscono ad aumentare la rigidità e la resistenza delle resine. Il processo di polimerizzazione è notevolmente diverso da quello di altre resine, infatti vengono usati induritori. Il Protocollo standard di processazione prevede i seguenti passaggi in ordine: Formalina, Alcool 50%, Alcool 70%, Alcool 80%, Alcool 95%, Alcool 95%, Alcool assoluto, Alcool assoluto, Alcool assoluto, 1° passaggio in Xilene, 2° passaggio in Xilene, 3° passaggio in Xilene, 1° passaggio in Paraffina alla T° di 56°/58°, 2° passaggio in Paraffina a T° di 56°/58°, 3° passaggio in Paraffina alla T° di 56°/58° e infine il 4° passaggio in Paraffina alla T° di 56°/58°. Un altro passaggio fondamentale da osservare è l'“Orientamento dei campioni” quindi bisogna: aprire la biocassetta e togliere il coperchio, individuare la base per inclusione di adeguate dimensioni, mettere della paraffina liquida, appoggiare su un piano freddo e inserire il campione, orientare il campione sul taglio.

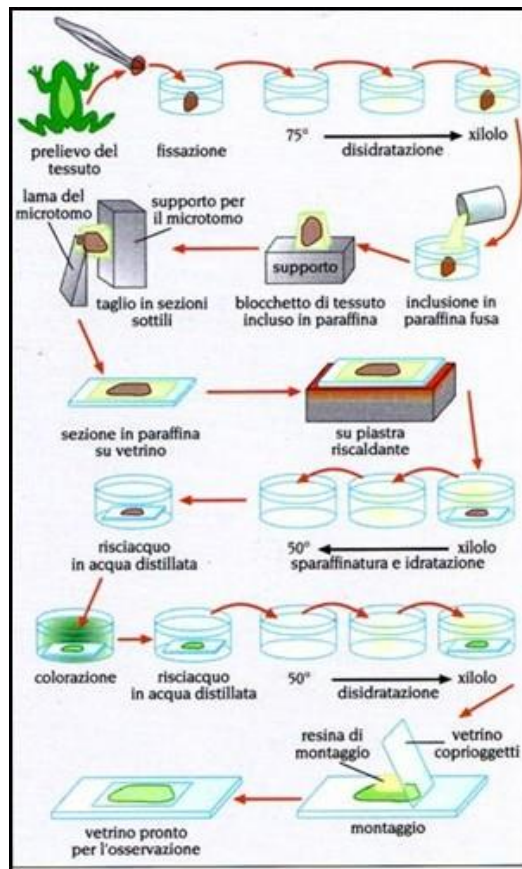


Figura 4.1: Inclusione in paraffina, i processi sono brevemente citati e possono subire modificazioni sia nel tipo che nei tempi secondo il tipo di tessuto.

Precisazioni da seguire in qualunque caso sono:

- tutti i tessuti vanno inclusi cercando di far aderire molto bene il campione alla base dello stampo;
- l'inclusione del campione, quando è visibile, va sempre effettuata sul taglio effettuato dal patologo (generalmente la parte messa in basso sulla cassetta);
- l'inclusione di tessuti frammentati va fatta cercando di concentrare i frammenti in un "base model" di adeguate dimensioni pressando bene;

- l'inclusione di agobiopsie richiede la massima attenzione e precisione nell'adesione di tutto il frustolo di tessuto alla base ed infine l'inclusione di biopsie endoscopiche si effettua ruotando di 90° il campione adagiato sulla carta.

Possiamo inoltre distinguere, due tipi di inclusione secondo il piano di taglio usato:

- Inclusione di taglio: si posiziona il campione generalmente con una parte larga e una stretta e sottile sulla parte sottile, perpendicolarmente al piano;
- Inclusione a fiammifero: il campione generalmente lungo e stretto va incluso su una delle basi minori, posto quindi verticalmente.

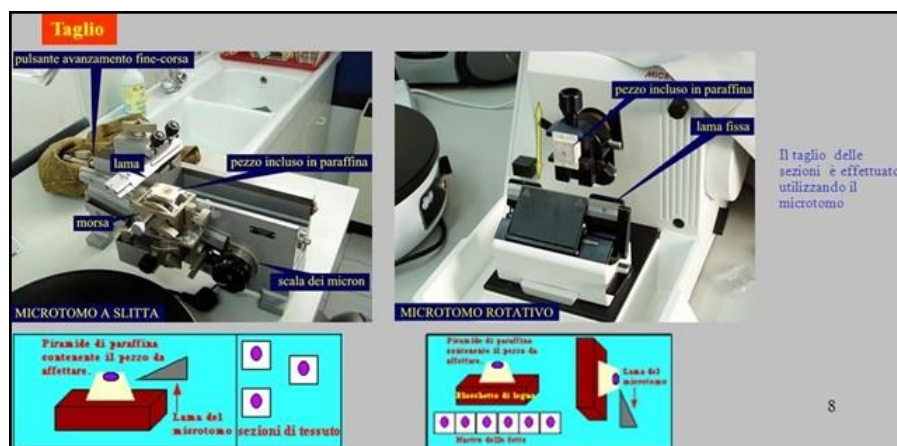


Figura 4.2: Tipi di taglio, in seguito ad inclusione in paraffina.

Il taglio al microtomo in sezioni dello spessore di 2 - 3 nm vengono fatte aderire al vetrino portaoggetti. Il nostro organismo e le cellule in esso presenti sono costituiti per il 70% da acqua e l'organizzazione delle loro molecole è tale da renderle traslucide. Essendo sostanzialmente trasparenti, cioè completamente attraversabili dai raggi di luce, esse sono quindi invisibili al microscopio. Per questo motivo sono state individuate una serie di sostanze capaci di colorare varie porzioni della cellula, rendendole così visibili. Per molti

di questi coloranti non è noto il meccanismo attraverso il quale si legano a particolari strutture o molecole. Per altri invece si conosce il carattere elettrostatico del legame. Un esempio sono i coloranti basici come l'Ematossilina, che ha affinità per molecole acide come il DNA (acido desossiribonucleico) o coloranti acidi, come l'Eosina che si lega a molecole basiche, come molte proteine citoplasmatiche. Queste caratteristiche tintoriali hanno portato a definire alcune strutture cellulari ed extracellulari come acidofile e basofile, in base alla loro colorabilità con coloranti acidi e basici rispettivamente. La maggior parte dei coloranti usati in istologia è rappresentata da molecole idrosolubili e quindi disciolte in acqua. Le sezioni da colorare sono imbevute di cera e perciò impermeabili all'acqua in cui i coloranti sono disciolti. Per colorare le sezioni occorre quindi preliminarmente rimuovere la paraffina, con l'uso di xilolo, e reidratare il tessuto attraverso un progressivo passaggio in alcol etilico sempre più diluito in acqua, fino ad immergerle in acqua corrente. L'Ematossilina lega il DNA e quindi colora intensamente il nucleo della cellula, dove questa molecola è presente ad altissima concentrazione. Ma l'Ematossilina colora allo stesso modo qualsiasi altra molecola ricca di cariche negative, compresi gli altri tipi di acidi nucleici o proteine acide.

### **Colorazione Ematossilina / Eosina**

L'ematossilina è una sostanza vegetale isolata da un estratto di legno azzurro (legno di campeggio, *Haematoxylum campechianum*) un albero originario del centro America. Questa è di per sé incolore (o si presenta sotto forma di cristalli giallo-bruni) incapace di colorare. Il vero colorante non è l'ematossilina, ma il suo prodotto di ossidazione: l'emateina (per questo all'ematossilina vanno aggiunte sostanze ossidanti come il permanganato di potassio, l'idrato di potassio, iodato di sodio, ecc.).

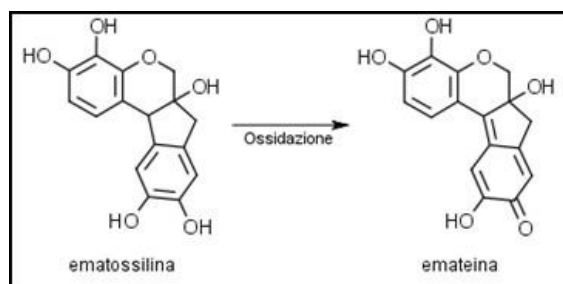


Figura 4.3: Reazione di ossidazione in seguito a legame del colorante con il tessuto.

L'emateina è colorata e costituisce il cromoforo, è anionica e non ha particolari affinità con gli acidi nucleici. Per conferire al composto una carica positiva è necessario aggiungere un mordente (ad es. l'allume potassico:  $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ ) che costituirà con l'emateina, una lacca relativamente insolubile: l'emallume. L'ematossilina più usata nel laboratorio è quella di Mayer, ed è costituita da: Allume di potassio, Ematossilina, Iodato di sodio, Acido citrico e Cloralio. Mentre l'eosina è un colorante artificiale debolmente acido, di cui esistono varie forme, che colora il citoplasma, il tessuto connettivo e la sostanza intercellulare in varie tonalità di rosa. L'eosina è chimicamente una tetrabromofluoresceina. Più precisamente, sono di comune utilizzo due molecole di eosina denominate Y e B.

### **Protocollo colorazione Ematossilina / Eosina**

Il protocollo di colorazione con ematossilina / eosina prevede l'utilizzo di sezioni di 2-3 nm poste a idratare con una scala discendente di Xilolo I (10') - Xilolo II (10') – Etanolo 100% (10') – Etanolo 95% (5') – Etanolo 70% (5') – Etanolo 50% (5'). Si pongono quindi i vetrini in acqua distillata (10'). Si aggiunge ematossilina goccia a goccia, per colorare i nuclei (6'), e si lava in acqua corrente, per eliminare il colorante in eccesso, e successivamente si passano i vetrini in acqua distillata. Si aggiunge eosina (2-3'), per colorare il citoplasma, e si lava

poi in acqua distillata. Si sottopongono i vetrini a disidratazione con scala ascendente di Etanolo 50% (5') – Etanolo 70% (5') – Etanolo 95% (5') - Etanolo 100% (10') e Xilolo II (10') e xilolo I (10'). Infine si montano i vetrini con Histochoice Mounting Media.

## **Tecnica immunoistochimica**

L'immunoistochimica è una tecnica di indagine che permette di identificare costituenti cellulari e tissutali come antigeni in situ, utilizzando anticorpi. Le tecniche di HIC possono essere applicate su cellule isolate su preparati istologici e citologici. Alcuni tumori possono essere diagnosticati con un semplice esame istologico, mentre altri per una corretta definizione richiedono l'ausilio di ulteriori indagini:

- Istochimiche;
- Immunoistochimiche;
- Biologia molecolare.

Infatti una definizione di immunoistochimica viene chiaramente descritta dall'AIRC (Associazione italiana per la ricerca sul cancro), come: “ una tecnica di indagine che permette di analizzare cellule o sezioni di tessuto prelevate dal paziente, per identificare se si tratti di cellule tumorali e per caratterizzarle meglio in modo da pianificare la cura. Questa tecnica diagnostica sfrutta la capacità di alcuni anticorpi di riconoscere proteine presenti sulla membrana delle cellule, dette antigeni, che nelle cellule tumorali possono avere caratteristiche diverse da quelle delle cellule normali. Il campione biologico viene di fatto "colorato" con questi anticorpi e osservato successivamente al microscopio. Un risultato positivo indica che effettivamente l'anticorpo ha riconosciuto una struttura che è peculiare del tipo di tumore sospettato”. Il principio dell'HIC prevede il riconoscimento di un

antigene mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico. L'antigene è una molecola proteica, glicoproteica o lipoproteina (con peso molecolare > 6000 daltons) capace di evocare una risposta immune da parte del sistema immunitario. Ogni antigene è costituito da uno o più siti antigenici, verso i quali l'anticorpo è diretto, che vengono anche denominati gruppi determinanti o epitopi. Disponendo dell'anticorpo specifico qualunque antigene può essere evidenziato mediante reazioni di HIC. Gli antigeni, a livello chimico-fisico, sono sensibili all'azione del calore, degli acidi, delle basi, dei solventi organici, dei detergenti e alle variazioni di pH. Mentre gli anticorpi sono formati da due catene polipeptidiche di 50 kDa, dette catene pesanti e da due catene di 25 kDa, dette catene leggere, legate tra loro mediante legami disolfuro. la reazione tra antigene e anticorpo avviene grazie a: congruenza della superficie molecolare tra i siti attivi di entrambe le molecole, legami di tipo debole (ponti di idrogeno, forze di van derWaals, attrazione tra dipoli). L'elevata specificità dell'interazione antigene-anticorpo ha portato allo sviluppo di vari saggi immunologici capaci di evidenziare un anticorpo o un antigene. Questi saggi svolgono un ruolo importante nella diagnostica clinica nel monitoraggio della risposta immunitaria umorale e nell'identificazione di molecole di interesse biologico o medico.

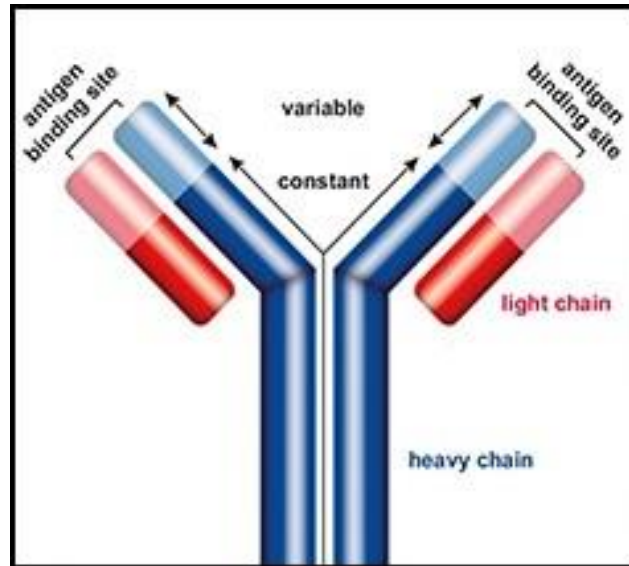


Figura 4.4: Struttura di un anticorpo, esplicitando le parti costanti e variabili, le catene pesanti e leggere e il sito di legame specifico dell'antigene.

Gli anticorpi possono essere essenzialmente di due tipologie:

- Anticorpi policlonali: vengono isolati da sieri animali immunizzati e raggruppano anticorpi diretti contro diversi epitopi dell'antigene usato per l'immunizzazione;
- Anticorpi monoclonali: vengono prodotti da un solo clone di una cellula B e tutti hanno la stessa specificità. Riconoscono un solo epitopo dell'antigene usato per l'immunizzazione. La selezione dei cloni di cellule B che producono specifici anticorpi può avvenire fuori dell'animale. Poiché le cellule B, una volta rimosse dall'organismo, non possono crescere e dividersi, ma muoiono all'incirca entro una settimana, per conservare la capacità di produzione di anticorpi dei vari cloni, la cellula B viene fusa con una cellula B tumorale (mieloma) che può vivere per un tempo indefinito al di fuori dell'animale ospite. La cellula ibrida (ibridoma), che si è così formata con la

fusione, può essere coltivata in vitro e può produrre l'anticorpo specifico delle cellule B.

Perché l'ibridoma sia stabile e possa produrre una quantità sufficiente di anticorpi monoclonali, la cellula B e la cellula di mieloma devono essere della stessa specie animale; il primo passaggio nella produzione di anticorpi monoclonali è identico a quello per produrre gli anticorpi policlonali. Un topo, che è l'animale più utilizzato per queste tecniche, viene immunizzato con un antigene purificato e comincerà a produrre anticorpi contro di esso. Dopo varie immunizzazioni di richiamo, il topo è sacrificato e la milza, ricca di linfociti B, viene rimossa.

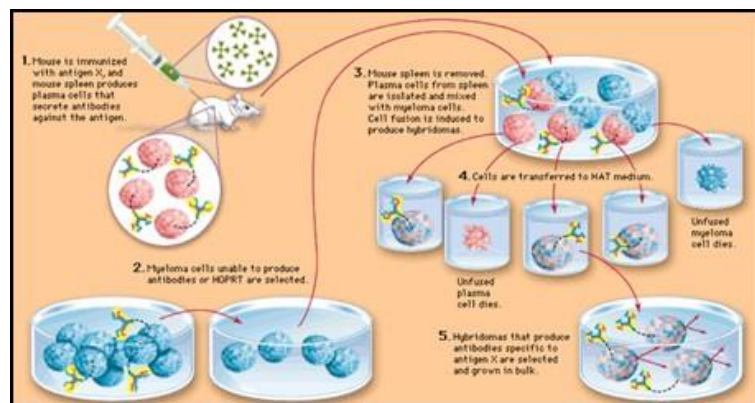


Figura 4.5: Schema illustrato della produzione di anticorpi monoclonali.

Numerose sono le preparazioni di anticorpi disponibili per le procedure di immunostochimica. La più facile da produrre, perché meno costosa e dunque più comune, è rappresentata dalla frazione di siero intero, costituita da sangue centrifugato per separare gli elementi cellulari. Oltre agli anticorpi specifici per l'antigene contro cui l'animale è stato immunizzato, essa contiene anche componenti ordinarie del siero come elettroliti, enzimi ed altre proteine, tra le quali sono presenti gli anticorpi normalmente prodotti dal sistema immunitario, anticorpi naturali e anticorpi aspecifici. Occasionalmente questi elementi possono interferire

con l'immunoistochimica e causare una colorazione aspecifica dovuta all'affinità di anticorpi cross-reagenti e di altre proteine sieriche, prevalentemente albumina, alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ) globuline, per alcune componenti tissutali. Poiché il solo elemento necessario per l'immunoistochimica è l'anticorpo specifico, la rimozione delle altre proteine ridurrà l'incidenza di reazioni non specifiche. I passaggi fondamentali della reazione di immunoistochimica possono essere schematicamente riassunti in:

- Prelievo;
- Fissazione;
- Inibizione delle perossidasi endogene;
- Antigen retrieval / Permeabilizzazione;
- Bloccaggio siti aspecifici;
- Incubazione Ab o anticorpo primario;
- Incubazione Ab secondario;
- Montaggio, Controlli e Lavaggi.

Il prelievo può derivare, brevemente, da: autopsia, necropsia o intervento chirurgico. La fissazione e l'inclusione dei tessuti è obbligatoria per preservare la struttura morfologica; i fissativi possono modificare, bloccare, mascherare o distruggere gli epitopi. Tra i fissativi più usati troviamo la formaldeide (formalina tamponata al 4-8%), questo perché non preclude nessun esame nell'ambito istologico (microscopia classica, IHC, ISH, FISH, biologia molecolare), inoltre ha un alto grado di penetrazione e una velocità di fissazione relativamente lenta (3-6 h). Purtroppo uno dei difetti, molto significativo, è la capacità

di mascherare gli epitopi. Uno dei passaggi fondamentali è quello di standardizzare la fissazione, cioè renderla ripetibile, al fine di ottenere il miglior risultato nell'immunologia. Infatti possiamo affermare che un tessuto troppo fissato o un tessuto nel quale i processi autolitici hanno preceduto una fissazione corretta sono difficili da correggere, come anche il mantenimento della struttura dell'antigene è difficile ed è considerata una fase critica. Segue l'inibizione delle perossidasi endogene, enzimi presenti nei perossisomi, nei macrofagi e nei globuli rossi in quei campioni in cui si vuole utilizzare un metodo di rivelazione enzimatica con, per esempio, perossidasi e DAB. Questo passaggio prevede l'utilizzo di acqua ossigenata al 3% (3 volumi) e Metanolo per circa 25 minuti. La prima fase importante di un'analisi di HIC su un materiale fissato e incluso in paraffina è quella di "correggere" le alterazioni degli epitopi causati dalla fissazione. Questo passaggio è cruciale per la riuscita della reazione immunologica e viene anche denominato "Antigen retrieval". Infatti, la fissazione del campione in PFA o paraffina può mascherare gli Ag o antigeni tissutali, impedendone la localizzazione da parte dell'Ab o anticorpo I° sia a causa dell'alterazione delle strutture molecolari che dell'instaurarsi di cross-legami. Quindi esistono due metodi per "smascherare" gli epitopi:

- Predigestione enzimatica;
- Trattamento termico.

La predigestione enzimatica prevede la standardizzazione del tempo d'incubazione e della concentrazione dell'enzima, per ogni metodica a dipendenza di quale complesso antigene-anticorpo vogliamo analizzare e visualizzare. Gli enzimi agiscono digerendo i legami aldeidici formati durante la fissazione, ma possono causare danni al tessuto o all'Ag. Gli enzimi utilizzati sono: Tripsina, Pronasi, Proteasi VII o Proteasi K e Pepsina. Mentre per quanto riguarda il trattamento termico, i vetrini sono immersi in un tampone citrato,

EDTA, Tris a pH variabili tra 6- 10 per un tempo e una temperatura da standardizzare per ogni metodica a dipendenza di quale complesso antigene-anticorpo. I trattamenti termici più utilizzati sono: microonde, pentola a vapore, bagnomaria e autoclave. Per esempio, nel Forno a microonde le sezioni vengono, inizialmente immerse in una soluzione tamponata (Tampone citrato 0,01M pH 6), poi 2-5 irradiazioni per 5 min alla massima potenza e infine vengono lasciate raffreddare. Il passaggio successivo è il bloccaggio dei siti aspecifici, dove per siti aspecifici si intendono i siti nel campione ai quali si possono legare in modo aspecifico sia l'Ab primario che l'Ab secondario. In questa fase vengono utilizzati solventi organici e detergenti come:

- PBS + BSA 0,1-1% 10 min. - 90 min. RT°;
- Siero 1:10 in PBS 10 min. - 90 min. RT°: siero pre-immune dell'animale in cui è stato prodotto il secondario. Infine, segue la "Ab II° goat anti-mouse, cioè l'incubazione con il siero di topo.

È molto importante ricordarsi di usare un siero della stessa specie in cui è stato prodotto l'anticorpo secondario e di non effettuare il lavaggio dopo il bloccante.

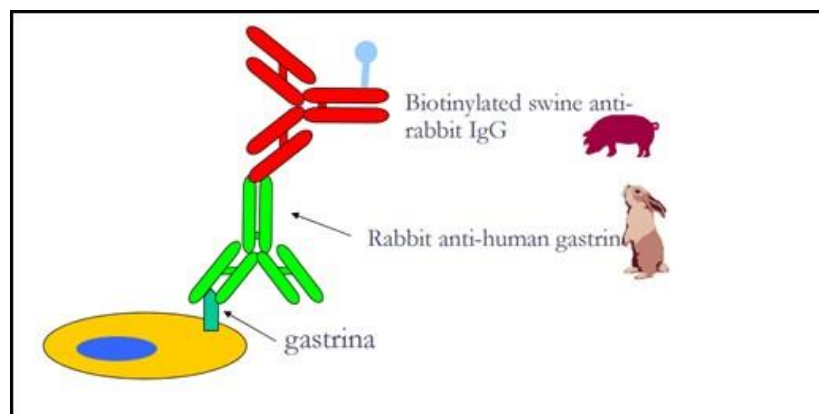


Figura 4.6: Relazione tra anticorpo primario e secondario.

Dopo aver effettuato il bloccaggio, è importante che per un buon esito di immunolocalizzazione si prendano in considerazione le caratteristiche dell'Ab primario, come:

- Specificità: cioè la capacità dell'Ab I° di riconoscere l'antigene anche dopo la fissazione con aldeidi;
- Sensibilità: capacità dell'Ab I° di riconoscere quantità minime di antigene: ciò dipende dalla fissazione/inclusione, dalla natura dell'antigene e dalla qualità del reagente.

Gli anticorpi primari, abbiamo precedentemente osservato, che possono essere monoclonali e policlonali, dovrebbero essere prodotti in una specie differente da quella da cui provengono i tessuti. Si può quindi procedere con l'incubazione dell'anticorpo primario e considerare in prima istanza la concentrazione dell'Ab. Quest'ultima deve essere individuata sperimentalmente, il titolo anticorpale (conc.Ab/ml) ottimale è definito come la più elevata diluizione che fornisce la marcatura specifica massima con la quantità minima di background. In seconda istanza si devono considerare il tempo e la temperatura di incubazione, anche questi devono essere determinati sperimentalmente. Generalmente l'equilibrio (saturazione dell'antigene con l'Ab) non viene raggiunto con tempi di incubazione minore di 20 minuti. Infine, viene effettuata l'incubazione con l'Ab secondario, dove il sistema di rilevamento dell'Ab I° legato all'antigene si effettua utilizzando un secondo Ab che riconosca l'Ab I° e che sia coniugato ad un fluorocromo o ad un altro sistema di rivelazione (per esempio enzimatico). L'Ab II° deve essere diretto contro le immunoglobuline della specie ospite dell'Ab I°. Per esempio, se l'Ab I° è un rabbit anti-mouse, la specie ospite è rabbit e l'Ab II° sarà un anti-rabbit.

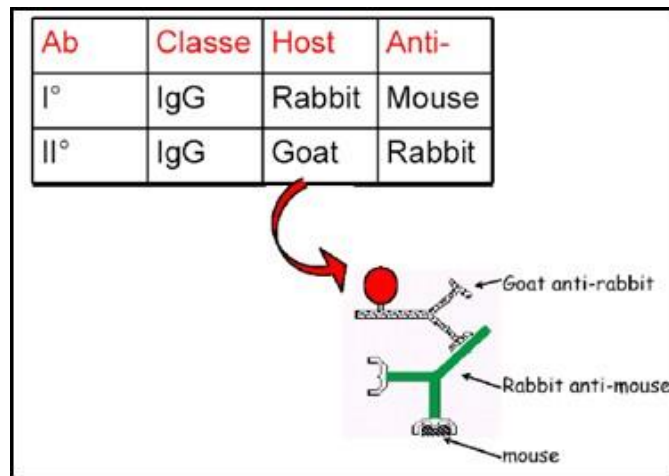


Figura 4.7: Schema possibili interazioni tra Ab I° e Ab.

Se l'anticorpo diretto contro l'antigene da cercare è marcato con un fluorocromo, il sito di reazione si rende evidente per la fluorescenza legata all'anticorpo che ha reagito con l'antigene. Se il marcatore è costituito da un enzima, esso, in presenza di un opportuno substrato, produrrà un precipitato colorato nel sito di reazione. D'altro canto, l'immuno-fluorescenza, tecnica di rivelazione più antica, ha due difetti principali: il primo è che il risultato non è stabile nel tempo e il secondo è che è fotosensibile cioè tende a decadere per effetto della luce. Per i precedenti motivi l'immunoistochimica è considerata la miglior tecnica di rivelazione. Uno svantaggio dell'HIC è la richiesta di manipolazione di substrati potenzialmente carcinogeni, numerose incubazioni addizionali e diversi step di lavaggio se paragonata alla fluorescenza. I metodi di immunoistochimica utilizzati per localizzare l'antigene possono essere:

- Metodo diretto: dove cioè viene utilizzato, per localizzare un antigene, un anticorpo diretto specificamente contro di esso;
- Metodo indiretto o con coniugati: si legano diversi tipi di marcatori all'anticorpo stesso, ne sono esempi i fluorocromi come la fluoresceina, enzimi come le perossidasi

o sostanze elettrondense come l'oro colloidale. Il metodo indiretto è più versatile rispetto a quello diretto perché può essere utilizzato con diversi anticorpi primari prodotti nella stessa specie animale quando è disponibile un unico anticorpo secondario coniugato con un marcatore. I tempi richiesti sono doppi rispetto al metodo diretto e i rischi che avvengano reazioni non specifiche sono più elevati;

- Metodo con immunocomplessi: queste molecole sfruttano la normale affinità tra antigene e anticorpo. Sono formati da un complesso formato artificialmente dall'enzima che catalizza la reazione con il cromogeno e da un anticorpo specifico per questo enzima. Questo metodo utilizza tre reagenti: l'anticorpo primario, che è specifico per l'antigene; l'anticorpo secondario o "ponte" e il complesso costituito da un enzima, la perossidasi, la fosfatasi alcalina o la  $\beta$ -galattosidasi, legato per via immune ad un anticorpo diretto contro l'enzima stesso. L'uso di immunocomplessi anziché di coniugati rende questa procedura fino a 1000 volte più sensibile rispetto alla immunofluorescenza;
- Metodo avidina / biotina: è uno dei metodi più recentemente scoperti per la colorazione HIC. Si è dimostrato utile nella localizzazione di numerosi antigeni in una varietà di campioni. Questo metodo può essere suddiviso a sua volta in altre tre tipologie:
  - Metodo diretto con avidina biotina;
  - Metodo indiretto con avidina biotina;
  - Metodo indiretto con avidina biotina ABC.

La biotina (o vitamina H o vitamina B8) venne scoperta a seguito di alcuni studi riguardanti le alterazioni cutanee e della crescita verificatesi in animali nutriti esclusivamente con

albume d'uovo crudo o proteine da esso estratte. Il fattore responsabile della comparsa della "malattia da bianco d'uovo" venne individuato nel 1931 e si è visto che esso è indispensabile per la corretta crescita dei mammiferi. Oggi è noto il fenomeno alla base di tale patologia: il legame tra la biotina e l'avidina (una glicoproteina dell'albume d'uovo). L'avidina è, infatti, resistente all'azione proteolitica dell'apparato gastrointestinale per cui il legame con la biotina rende quest'ultima non assorbibile.

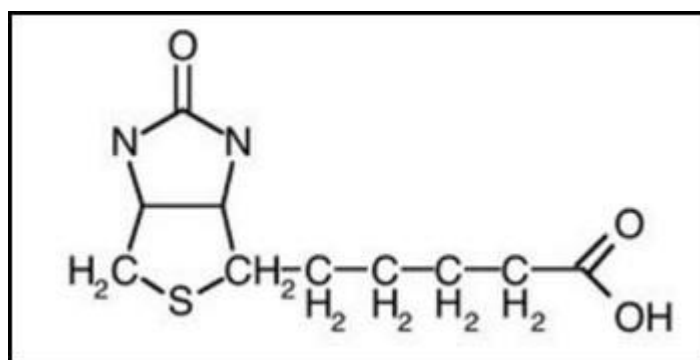


Figura 4.8: Struttura chimica della molecola di Biotina o Vitamina H.

Mentre l'avidina è una glicoproteina tetramericata che lega specificamente la biotina. L'avidina è un fattore antinutrizionale poiché agisce chelando la biotina che è presente negli alimenti costituiti da proteine di deposito, come uova e semi. Nell'uovo crudo la biotina è chelata dall'avidina; per rompere questo legame bisogna denaturare la glicoproteina con un'azione termica, la cottura, in questo modo viene liberata la biotina. L'avidina è così chiamata per l'avidità con cui tiene la biotina. Ciascuno di essi presenta vantaggi e svantaggi che devono essere opportunamente valutati prima della scelta della procedura più efficace per le proprie esigenze. È consigliata l'amplificazione, la quale aumenta la sensibilità e cioè permette la rivelazione di quantità più piccole di Ag con la stessa quantità di Ab o aumenta la specificità mediante la rivelazione della stessa quantità di Ag con

una diminuita quantità di Ab. L'aumentata sensibilità delle tecniche immunoenzimatiche rispetto alla immunofluorescenza è dovuta proprio a questa possibilità di amplificazione progressiva. Una molecola fluorescente può cedere soltanto una piccola quantità di luce visibile, mentre un enzima può produrre molte molecole colorate, se sono disponibili abbastanza substrato e tempo di azione. A seconda degli enzimi utilizzati, numerosi sono i cromogeni che fungono da substrato e possono agire come donatori di elettroni nella reazione enzimatica dando origine ad un prodotto di reazione finale colorato che localizzerà l'antigene mediante la formazione di un precipitato nelle immediate vicinanze del punto in cui è avvenuta la reazione. Un esempio enzimatico molto diffuso sono le perossidasi (POD), le quali catalizzano la reazione tra un donatore di elettroni che si ossida formando un prodotto finale di reazione costituito da una molecola colorata, e il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) che sarà ridotto ad acqua ( $H_2O$ ). Molto importante è la concentrazione dell' $H_2O_2$ , poiché una concentrazione insufficiente non spingerà la reazione verso la formazione dei prodotti, tra cui la molecola colorata, mentre un eccesso inibirà l'azione dell'enzima e quindi la colorazione. La concentrazione utilizzata è di 0,03% pari a 0,1 ml di  $H_2O_2$  al 3% in 10ml di soluzione substrato. La 3,3-diaminobenzidina (DAB) è il substrato di scelta per la immunoperossidasi. Produce una intensa colorazione marrone resistente all'alcol. I vetrini colorati con DAB possono essere disidratati, montati in mezzi di montaggio con i metodi convenzionali e conservati a lungo, perché la reazione produce un precipitato di colore marrone, non solubile in acqua o alcol. La DAB inoltre è elettrondensa e ciò la rende utile anche per studi di immunoperossidasi ultrastrutturali. A livello pratico bisogna porre 4-6 gocce su ciascun campione ed incubare per 5 minuti a temperatura ambiente, risciacquare con acqua e contro colorare se necessario. Il principale svantaggio della DAB (un derivato della benzidina) è che essa è irritante ed è considerata un sospetto carcinogeno.

Altri cromogeni, meno usati come substrato delle POD, sono: il 3-amino-9-etilcarbazolo (AEC) produce un prodotto terminale marrone-rosso che è insolubile in acqua e solubile in alcol. Quindi i campioni non devono essere disidratati, ma montati con un medium a base acquosa. Bisogna aver cura di evitare l'inalazione della polvere o il contatto con la pelle. Un altro cromogeno è il 4-cloro-1-naftolo, precipita come un prodotto terminale blu-nero insolubile in H<sub>2</sub>O e solubile in alcol, che tende a diffondere dal sito di precipitazione. Quindi i vetrini non possono essere conservati per una documentazione permanente. Un'altra procedura necessaria è la controcolorazione e il montaggio, queste avvengono in modi diversi secondo il tipo di soluzione di substrato utilizzata. L'esempio di soluzione più diffusa è quella trattata con cromogeni (DAB) i cui prodotti terminali sono insolubili in alcol e solventi organici. Per questa tipologia bisogna, a livello di pratica di laboratorio, sciacquare delicatamente il vetrino con acqua per rimuovere il substrato che non ha reagito, immergere il vetrino direttamente in una vaschetta di colorazione contenente ematossilina di Harris e incubare per cinque minuti. Lavare bene il vetrino in acqua corrente per 3-4 minuti fino al viraggio al blu dell'ematossilina. L'intensità della controcolorazione può essere regolata aumentando o diminuendo il tempo di colorazione in ematossilina. Una colorazione troppo intensa può mascherare la positività della perossidasi. La fase finale prevede il montaggio del vetrino per la conservazione del campione colorato. Per conservarlo bisogna montare sul vetrino portaoggetti un vetrino copri oggetti e per fare questo sono disponibili delle resine che permettono, una volta essiccato il campione sul vetrino, un effetto collante, che possono essere resine naturali come il balsamo del Canada, o sintetiche. Una precauzione da adottare durante il montaggio del vetrino copri oggetti è quello di evitare l'intrappolamento delle bolle d'aria, le quali provocano la mancata visibilità o la poca visibilità del campione al microscopio. Un importante criterio di scelta

del mezzo di montaggio è la solubilità del prodotto di reazione. Prendendo sempre come esempio i campioni i cui prodotti terminali sono insolubili in alcol, possono e devono essere disidratati con una scala decrescente di alcoli, chiarificati in xilolo e montati con mezzi di montaggio a base di xilene o toluene. Mentre per quanto riguarda i preparati solubili in alcol, questi campioni dovrebbero essere dunque montati, ancora umidi, con un mezzo di montaggio a base acquosa o con la miscela gelatina-glicerolo di Kaiser facilmente reperibile in commercio.

## **Protocollo IHC**

Le sezioni paraffinate di 2-3 nm, su vetrini a carica, vengono trattate con l'analisi immunostochimica per permetterci di evidenziare la presenza di citochine pro-infiammatorie e dei fattori di crescita coinvolti nella formazione delle cisti sinoviali. La reazione IHC utilizzato è quello che prevede la formazione del complesso Avidina-Biotina-Perossidasi, basata quindi sull'amplificazione del segnale ad opera del complesso ABP. Prima di procedere con il protocollo, bisogna accertarsi di siglare ogni vetrino con le specifiche coordinate proprie di quel vetrino attraverso il pennarello vetrografico o con la matita a carboncino. Il primo passaggio prevede la cosiddetta "paraffinatura" o eliminazione della paraffina. Quest'ultimo può essere effettuato con un processo di idratazione attraverso una scala discendente di alcoli, quindi in ordine:

- 1° passaggio nello xilolo per circa 10 minuti;
- 2° passaggio nello xilolo per circa 10 minuti;
- Alcol a 100% per circa 5-7 minuti;
- Alcol a 95% per circa 5-7 minuti;

- Alcol a 70% per circa 5-7 minuti;
- Alcol a 50% per circa 5-7 minuti;
- Acqua corrente per circa 10 minuti.

Segue lavaggio in PBS e smascheramento antigenico in tampone citrato a pH 6 per 20 minuti ad alte temperature. Dopo raffreddamento e lavaggio in PBS segue il blocco delle perossidasi endogene. I vetrini sono stati posti in metanolo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% a temperatura ambiente per circa 30 minuti. Segue un secondo lavaggio in PBS e il posizionamento dei vetrini in camera umida dove, vengono asciugati e segnati i margini della sezione sul vetrino con un kit, detto kit block, per poi rimettere il PBS che ne permette la corretta conservazione. Si toglie il PBS, e si pone per prima la soluzione di Avidina su tutte le sezioni, precedentemente delimitate, per un tempo di incubazione di circa 15 minuti. Secondariamente pongo la soluzione di Biotina per lo stesso tempo dell'Avidina, cioè per 15 minuti. Per eliminare i legami aspecifici i vetrini sono stati incubati per 1 h a temperatura ambiente in camera umida con siero normale ottenuto dalla specie animale nella quale è stato ottenuto l'anticorpo secondario. Tale soluzione di blocco dei legami aspecifici è formata da PBS, 15-20% di siero normale della specie animale dal quale è stato ottenuto l'anticorpo secondario, 1% siero albumina bovina (BSA) e viene preparata poco prima dell'incubazione. Effettuo un ulteriore lavaggio in PBS, le sezioni vengono incubate con l'anticorpo primario specifico per la proteina di cui si vuole quantificare l'espressione, diluito in PBS con normal serum al 20% e BSA all'1%, e dopo lavaggio in PBS, è stato aggiunto l'anticorpo secondario biotinilato diluito in PBS in camera umida a temperatura ambiente per 1,5 h. Dopo due lavaggi con tampone fosfato, i vetrini sono stati trattati per 30 minuti con il complesso avidina-biotina-perossidasi per amplificare il segnale di espressione della proteina d'interesse. La 3,3-diaminobenzidina (DAB), essendo il substrato della perossidasi

(HRP), induce la formazione di un prodotto colorato marrone insolubile in alcol. Per la controcolorazione i vetrini sono stati immersi in ematossilina di Mayer (5 minuti) ponendoli poi in acqua corrente. Per la disidratazione, infine, i vetrini sono stati sottoposti ad una scala ascendente di alcoli (scala opposta rispetto a quella precedentemente descritta). Infine, i vetrini sono stati montati con il balsamo o Vecta Mount e coperti con il vetrino coprioggetti. Per quanto riguarda le diluizioni e l'animale di estrazione degli anticorpi primari, si possono riassumere nel seguente elenco:

- Anticorpo monoclonale di topo anti-VEGF-A con diluizione 1:100, riconosce la proteina ricombinante VEGF189 di origine umana;
- Anticorpo policlonale di coniglio anti-TGF- $\beta$ 1 con diluizione 1:200, riconosce un epitopo al C-terminale del TGF- $\beta$ 1 di origine umana;
- 3. Anticorpo monoclonale di topo anti-TNF- $\alpha$  con diluizione 1:150, riconosce l'intera lunghezza della proteina nativa TNF- $\alpha$  di origine umana;

## Capitolo 5

### Risultati

E' stata valutata l'espressione di diversi fattori di crescita proinfiammatori e angiogenici attraverso tecniche di immunistochemica con cui è stato possibile individuare la distribuzione e la localizzazione dei fattori trofici e il tasso di proliferazione cellulare nei campioni di mucosa nasofaringea asportati chirurgicamente da pazienti affetti da angiofibroma nasofaringeo. Grazie a specifici anticorpi, è stato possibile evidenziare un'intensità di colorazione dei tessuti di vario grado di intensità a seconda del livello di immunoreattività. Le sezioni mostrano una colorazione nero-marrone indice di un'immunoreattività intensa, giallo-marrone quando è presente un'immunoreattività più debole, oppure nessuna immunoreattività, come mostrato nelle figure che seguono.

L'intensità della reazione immunistochemica è stata valutata suddividendo le osservazioni relative alla percentuale di espressione delle molecole indagate nei vari strati tissutali caratterizzanti la struttura istologica analizzata. Il livello di espressione è stato analizzato e rappresentato graficamente nelle tabelle riportate nel testo, in cui la diversa intensità dell'immunoreattività viene indicata con simboli di positività (+), in caso di presenza di reazione, e con simboli di negatività (-), in caso di assenza della stessa (Tab. I - II).

L'intensità e la densità di distribuzione dell'immunoreazione è stata valutata in modo microdensitometrico con un programma di analisi di immagine IAS 2000 (Delta Sistemi, Roma), collegato al microscopio ottico tramite una macchina fotografica digitale. Attraverso la colorazione ematossilina / eosina è stato possibile rilevare, nei tessuti patologici, il sito di proliferazione caratteristico dell'angiofibroma naso-faringeo, non presente nel tessuto sano di controllo, in cui è presente esclusivamente tessuto connettivo con fibroblasti dispersi e piccoli vasi sanguigni. Le fibromatosi in genere sono il risultato di un'abnorme ed alterata proliferazione dei fibroblasti, legata ad un'eccessiva espressione dei fattori di crescita stessi. Sembra che i fattori in grado di stimolare la crescita dei fibroblasti siano anche in grado di indurre la loro differenziazione in miofibroblasti e stimolare la produzione di matrice extracellulare, anche attraverso stimoli meccanici. La connessione tra la progressione della malattia e l'infiammazione localizzata nel tessuto dell'angiofibroma resta sconosciuta, insieme con i meccanismi molecolari attraverso cui le citochine infiammatorie inducono la differenziazione dei miofibroblasti. A differenza dei fibroblasti che sono gli elementi più rappresentativi del tessuto connettivo lasso e appaiono come elementi fusati con nucleo allungato, i miofibroblasti hanno un nucleo incavato, filamenti citoplasmatici in linea con l'asse longitudinale della cellula, evidente reticolo endoplasmatico rugoso e presentano caratteri intermedi tra le cellule muscolari lisce e i fibroblasti con microfilamenti del citoscheletro costituiti dalla proteina alfa-actina del muscolo liscio ( $\alpha$ -SMA) che facilita la loro contrazione e la loro migrazione. Le cellule fusiformi del tessuto dell'angiofibroma nasofaringeo risultano positive all' $\alpha$ -SMA, indicatore certo del fenotipo miofibroblastico. L'obiettivo del nostro studio è stato quello di mettere in evidenza le molecole determinanti l'insorgenza e la progressione della malattia in modo da identificare nuovi potenziali "targets" terapeutici. Quindi abbiamo posto la nostra attenzione sull'identificazione dei livelli di

espressione dei fattori di crescita nei tessuti dell'angiofibroma, rimossi attraverso intervento chirurgico. Il fattore di crescita maggiormente coinvolto nel controllo della crescita cellulare dei miofibroblasti è il Fattore di crescita trasformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), che causa anche proliferazione delle cellule endoteliali vascolari inducendo l'angiogenesi, processo importante per la crescita e la riparazione tissutale. I nostri studi hanno dimostrato che TGF- $\beta$ 1, è fortemente espresso a livello della matrice extracellulare, nel fenotipo miofibroblastico e fibroblastico a livello citoplasmatico. Anche i fibroblasti normali della mucosa nasofaringea di controllo esprimono TGF- $\beta$ 1, ma a concentrazioni più basse. I nostri dati mostrano che questo fattore di crescita svolge un ruolo cruciale nello sviluppo e nella progressione della malattia e sembrerebbe anche giocare un ruolo significativo nella recidiva della malattia dopo intervento chirurgico. TGF- $\beta$ 1, rilasciato dai fibroblasti in condizioni di insulto tissutale, sembra essere coinvolto nella differenziazione dei fibroblasti in miofibroblasti e nell'eccessiva deposizione di collagene, causando una reazione infiammatoria che si traduce in fibrosi. Inoltre modula la migrazione cellulare, la proliferazione e la sintesi proteica nel corso di vari processi fisiologici e patologici. Attraverso studi di immunofluorescenza abbiamo rilevato che l'intensità di espressione di TGF- $\beta$ 1 è maggiore nei fibroblasti e miofibroblasti patologici rispetto a quelli controllo e che la colorazione all'interno del citoplasma di queste cellule non è uniforme, ma appare di tipo granulare. Nel nostro studio abbiamo inoltre mostrato l'espressione fortemente positiva alla reazione immunostochimica del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) a livello di fibroblasti e miofibroblasti nei tessuti angiofibromatosi, diversamente dal tessuto di controllo in cui VEGF non è espresso. Nei noduli proliferativi di tessuto patologico VEGF mostra una forte espressione a livello delle cellule endoteliali dei vasi mentre nel tessuto normale si ha solo una debole espressione di esso nell'endotelio vascolare. Dagli esperimenti di immunofluorescenza è possibile

identificare una marcata espressione di VEGF a livello dell'epitelio ghiandolare. Questi dati ci permettono di ipotizzare che l'angiofibroma nasofaringeo insorga come una reazione fibrotica analoga al processo di guarigione delle ferite in cui l'angiogenesi, che consiste nella formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da vasi pre-esistenti, svolga un ruolo cruciale inducendo alla continua vascolarizzazione del tessuto fibrotico. Nel nostro lavoro abbiamo dimostrato con l'immunoistochimica che il fattore di necrosi tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), è espresso nella matrice extracellulare del sito di proliferazione miofibroblastico presente in pazienti affetti da angiofibroma nasofaringeo. La risposta pro-infiammatoria indotta dalla crescita neovascolare comporta anche la migrazione chemiotattica di macrofagi che secernono il TNF- $\alpha$  che induce angiogenesi. TNF- $\alpha$  risulta moderatamente presente nei miofibroblasti patologici dell'angiofibroma e a livello delle cellule endoteliali capillari. Nel tessuto connettivo lasso della mucosa nasofaringea normale tale fattore infiammatorio è comunque moderatamente positivo nel citoplasma delle cellule fibroblastiche e nella matrice extracellulare. Sembra che il TNF- $\alpha$  partecipi al processo fibrotico se lega il recettore TNFR2 (fortemente espresso nei fibroblasti patologici, ma assente in quelli normali) ma non quando lega il recettore TNFR1 che invece causa l'apoptosi. Tale fattore di crescita è anche fortemente espresso nel citoplasma delle cellule secernenti delle ghiandole sudoripare immerse nel derma in prossimità dei noduli patologici. Attraverso esperimenti di immunofluorescenza è stato dimostrato come TNF- $\alpha$  fosse espresso sia nei fibroblasti normali sia nei miofibroblasti patologici con debole localizzazione citoplasmatica.

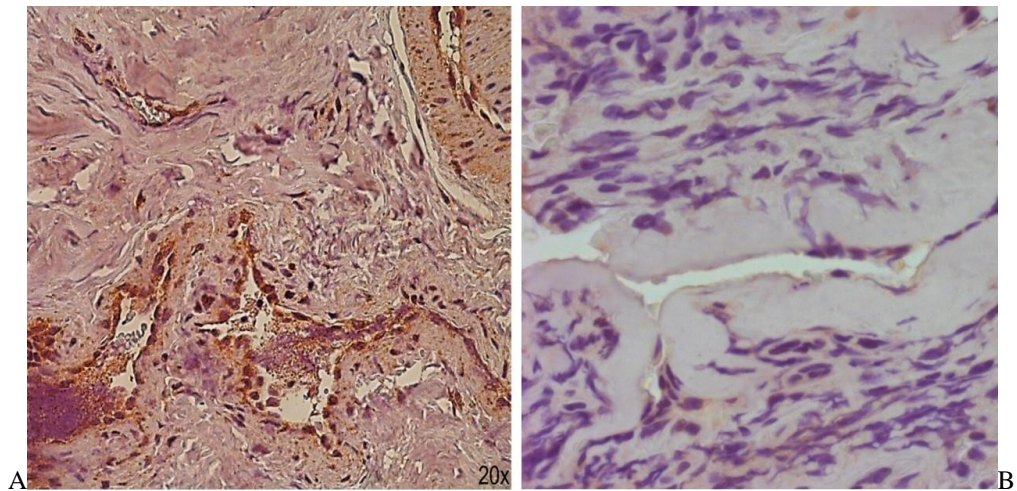


Figura 5.1: Fig.A Angiofibroma. Età 16 anni. Espressione immunohistochemica del fattore di crescita TGF- $\beta$  (20x). Esame microscopico: la neoformazione appare costituita da una proliferazione di strutture vascolari di calibro variabile ora filiformi ora di aspetto lacunare, rivestite da un singolo strato di cellule endoteliali. Tali vasi sono immersi in uno stroma connettivo fibroso per lo più denso con fibroblasti fusati o stellati prevalentemente a disposizione perivascolare. Si evidenzia all'interno dei vasi la presenza di globuli di materiale estraneo amorfo verosimilmente riferibile a embolizzazione. Fig.B Tessuto normale di controllo in cui sono assenti i fibroblasti perivascolari.

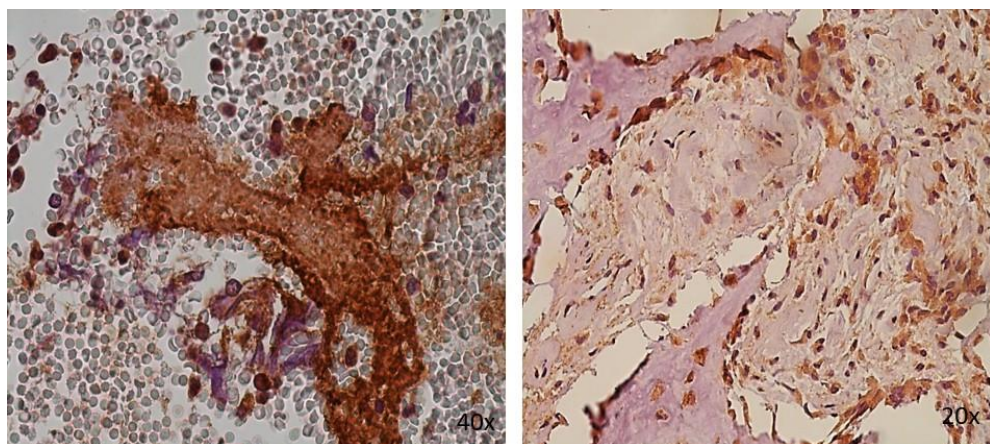


Figura 5.2: Angiofibroma Età: 16 anni. Espressione immunohistochemica del fattore di crescita TGF (40x). L'analisi immunohistochemica ha mostrato positività per il fattore di crescita TGF- $\beta$ .

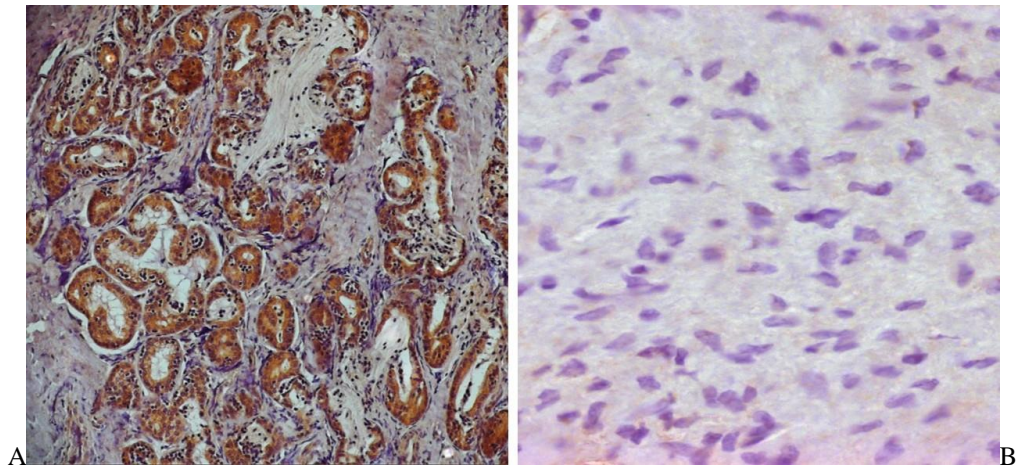


Figura 5.3: Fig.A Angiofibroma Età: 14 anni. Espressione immunoistochimica del fattore di crescita VEGF (20x). Marcata espressione di VEGF a livello dell'endotelio ghiandolare. Fig.B Tessuto normale di controllo in cui non risulta presente l'espressione del VEGF.

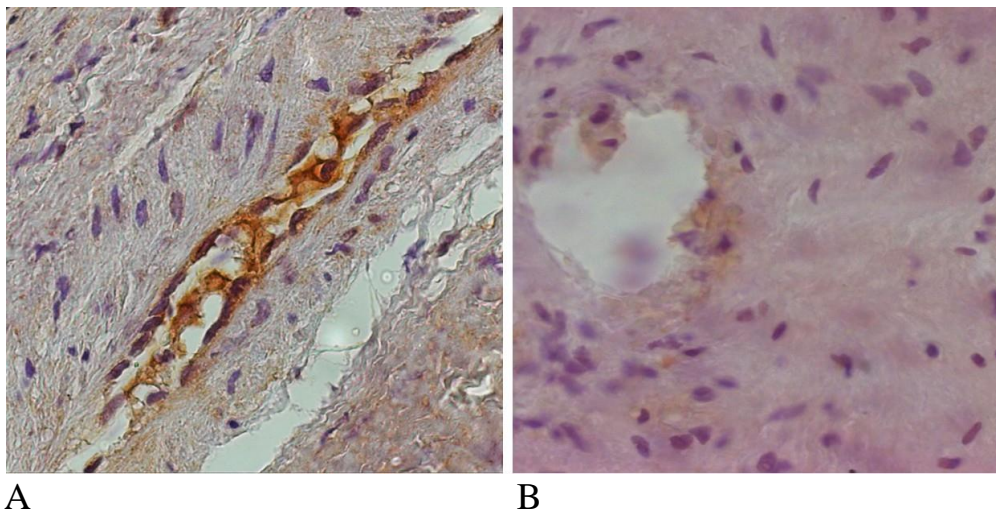
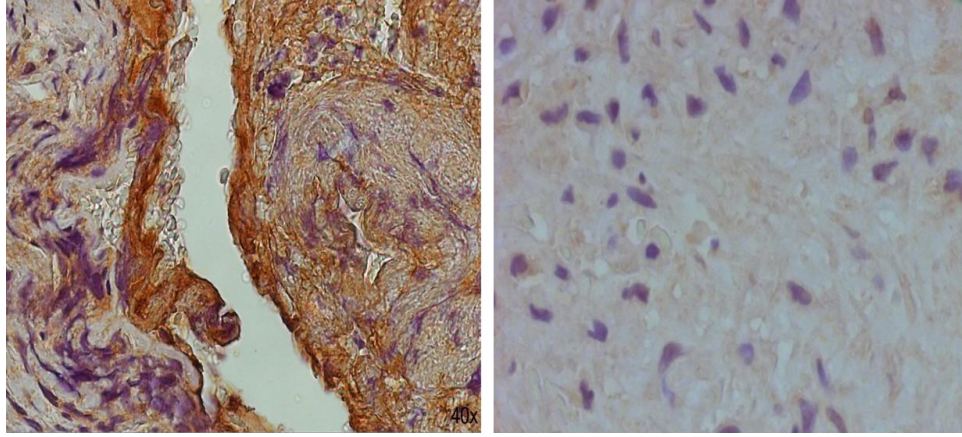


Figura 5.4: Fig.A Angiofibroma Età:14 anni (G-13069). Espressione immunoistochimica del fattore di crescita VEGF (40x). Esame microscopico: la neoformazione appare costituita da una proliferazione di strutture vascolari, il VEGF è risultato ampiamente espresso a livello dell'endotelio vascolare. Fig.B Tessuto normale di controllo in cui il VEGF non risulta espresso.



A

B

Figura 5.5: Fig.A Angiofibroma Età: 14 anni (G-13069). Espressione immunoistochimica del fattore di crescita TNF (40x). Esame microscopico: la neoformazione appare costituita da una proliferazione di strutture vascolari che hanno mostrato forte positività per il TNF. Fig.B Tessuto normale di controllo in cui non risulta presente l'espressione del TNF.

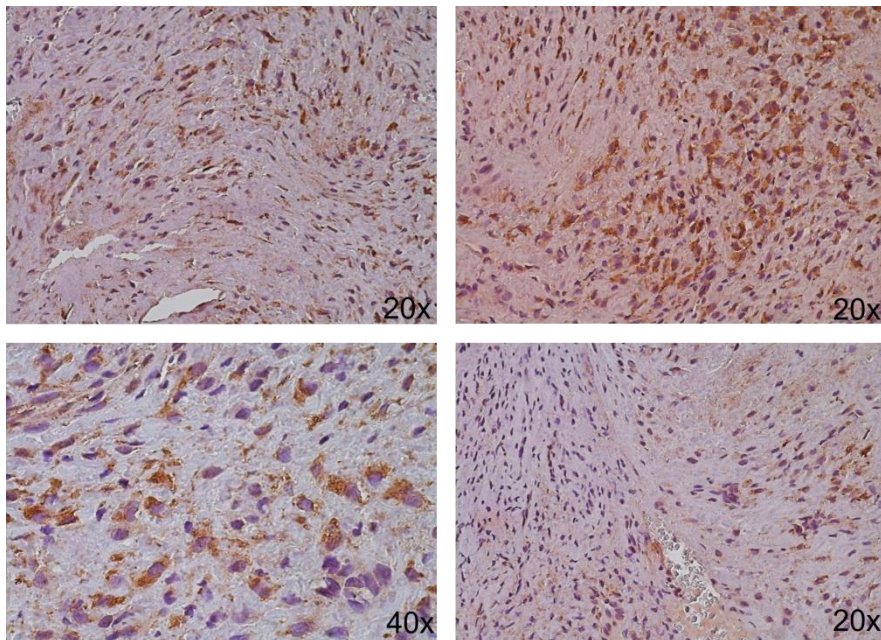


Figura 5.6: Angiofibroma Età: 14 anni. Espressione immunoistochimica del fattore di crescita TGF. Marcata espressione del TGF a livello citoplasmatico, modificazione della ECM con evidente proliferazione dei miofibroblasti.

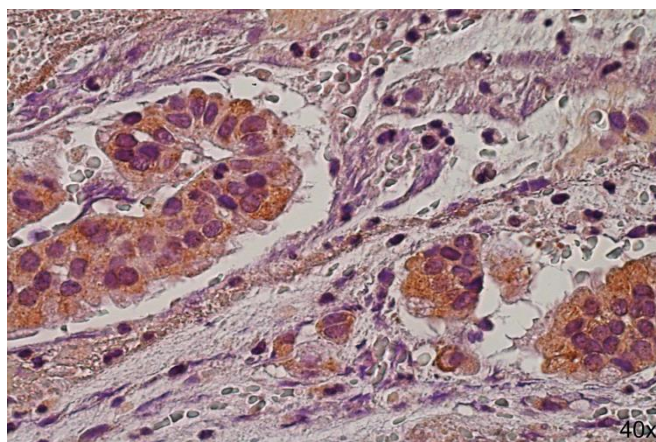
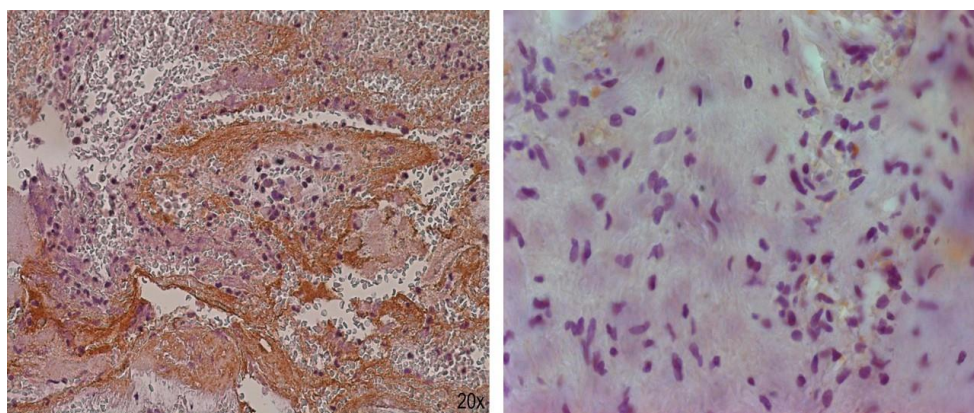


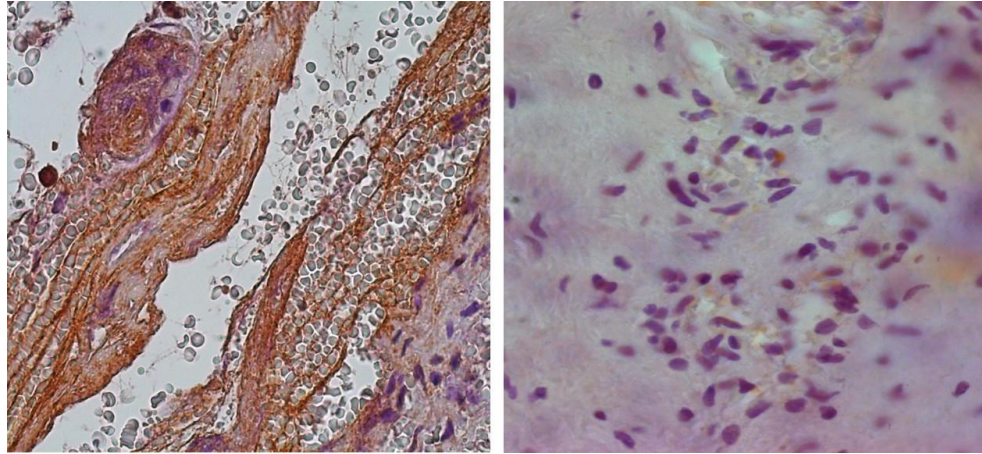
Figura 5.7: Angiofibroma Età: 14 anni. Espressione immunohisto- chimica del fattore di crescita VEGF (40x). Esame microscopico: mucosa di tipo respiratorio con proliferazione neoplastica costituita da tessuto fibroso ipocellulare che circonda numerosi canali vascolari. VEGF è risultato espresso a livello dell'epitelio ghiandolare.



A

B

Figura 5.8: Fig.A Angiofibroma Età: 14 anni. Espressione immunohisto- chimica del fattore di crescita TNF (20x). Esame microscopico: mucosa di tipo respiratorio con proliferazione neoplastica costituita da tessuto fibroso ipocellulare che circonda numerosi canali vascolari, forte immunoreattività citoplasmatica per TNF. Fig.B Tessuto normale di controllo in cui è presente solo lievemente l'espressione del TNF.



A

B

Figura 5.9: Fig.A Angiofibroma Età: 14 anni. Espressione immunostochimica del fattore di crescita TGF (40x). Esame microscopico: proliferazione neoplastica costituita da tessuto fibroso ipocellulare che circonda numerosi canali vascolari. Fig.B Tessuto normale di controllo in cui è presente solo lievemente l'espressione del TNF- $\beta$ .

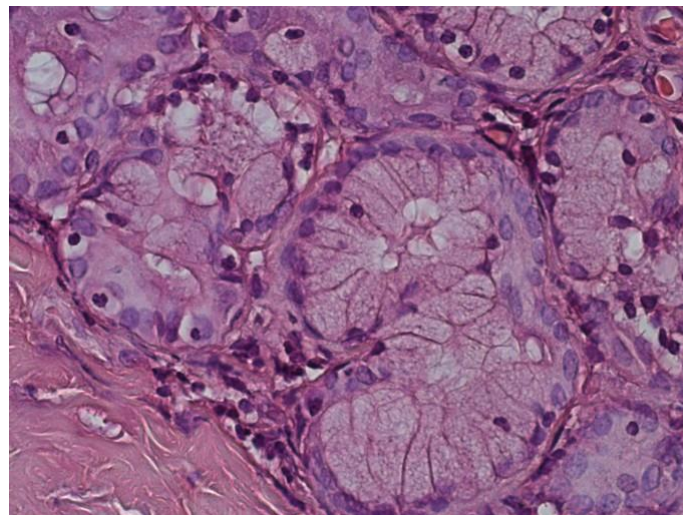


Figura 5.10: Angiofibroma. Colorazione Ematossilina Eosina (40x)

**Tabella I.** Livello di espressione di fattori trofici TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  e VEGF nei tessuti dell'Angiofibroma nasofaringeo. (+++: forte immunoreattività; ++: rilevante immunoreattività; +: moderata immunoreattività; +/-: debole immunoreattività; -: assenza di immunoreattività).

| FATTORI DI CRESCITA | LOCALIZZAZIONE         | LIVELLO DI ESPRESSIONE |
|---------------------|------------------------|------------------------|
| TGF- $\beta$ 1      | Miofibroblasti         | +++                    |
|                     | Fibroblasti            | ++                     |
|                     | Matrice extracellulare | +++                    |
|                     | Vasi sanguigni         | +++                    |
| TNF- $\alpha$       | Strutture vascolari    | +++                    |
|                     | Miofibroblasti         | +                      |
|                     | Fibroblasti            | +                      |
|                     | Matrice extracellulare | +                      |
| VEGF-A              | Miofibroblasti         | +++                    |
|                     | Fibroblasti            | +++                    |
|                     | Matrice extracellulare | +++                    |
|                     | Vasi sanguigni         | +++                    |

**Tabella II.** Livello di espressione dei fattori trofici TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  e VEGF nei tessuti di mucosa nasofaringea normale di controllo. (+++: forte immunoreattività; ++: rilevante immunoreattività; +: moderata immunoreattività; +/-: debole immunoreattività; -: assenza di immunoreattività).

| FATTORI DI CRESCITA | LOCALIZZAZIONE  | LIVELLO DI ESPRESSIONE |
|---------------------|---|------------------------|
| TGF- $\beta$ 1      | Fibroblasti<br>Matrice extracellulare<br>Vasi sanguigni | +<br>-<br>+            |
| TNF- $\alpha$       | Fibroblasti<br>Matrice extracellulare<br>Vasi sanguigni | +<br>+<br>+            |
| VEGF                | Fibroblasti<br>Matrice extracellulare<br>Vasi sanguigni | -<br>-<br>+            |

Nella tabella I sono descritti i livelli di espressione dei fattori di crescita TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  e VEGF nei tessuti di angiofibroma; nella tabella II sono invece descritti i livelli di espressione degli stessi fattori di crescita nel tessuto di controllo.

## Capitolo 6

### Discussione

L'angiofibroma giovanile o nasofaringeo è una malattia fibro-proliferativa con decorso benigno che però può causare gravi danni a livello funzionale. Esso è un tumore raro fibrovascolare benigno, localmente aggressivo, che origina dalla parete posterolaterale del rinofaringe, interessando prevalentemente maschi durante la tarda infanzia e l'adolescenza (la malattia esordisce di solito tra i 7 e i 19 anni) e si presenta sotto forma di massa nella cavità nasale e nel rinofaringe, provocando ostruzione nasale, epistassi (è il sintomo più importante) edema facciale importante, proptosi, diplopia. Sebbene la progressione sia lenta, la malattia presenta un elevato tasso di recidive e talvolta invade le strutture adiacenti (seni paranasali, pavimento dell'occhio o cavità cranica) Comprende circa il 5% di tutti i tumori della testae del collo. Suggestiva è l'origine del tumore dallo stroma fibrovascolare in cui i vasi sono ricchi di endotelio e poveri di tunica muscolare. Macroscopicamente l'JNA viene generalmente descritto come una massa di colorito variabile dal rosa-grigio al rosso purpureo, lobulato, di consistenza gommosa.

Il tumore presenta una componente cellulare costituita da fibrociti di forma sottile o stellata immersa in una matrice connettivale variamente rappresentata. La componente vascolare

è costituita da vasi capillari e da ampie lacune ripiene di sangue, rivestite soltanto da cellule endoteliali. La componente stromale è invece costituita da elementi cellulari di tipo fibroblastico in grado di produrre fibre collagene. Spesso individuabili anche cellule muscolari od elementi di transizione tra i due istotipi; è questo riscontro istologico che ha portato alcuni autori ad ipotizzare una ipotetica trasformazione delle cellule endoteliali vasali in elementi cellulari stromali. La fase proliferativa è caratterizzata dalla proliferazione dei miofibroblasti che poi scompaiono lasciando fibroblasti maturi associati a fasci di tessuto collagene. La patogenesi resta tuttora incerta; esistono varie teorie di cui le più accreditate sono:

- Teorie infiammatorie: allo stato attuale godono di pochi riscontri;
- Teorie disembrionogenetiche: ipotizzano l'origine del tumore dal periostio embrionario dell'osso occipitale e dalla faccia anteriore di C1-C2;
- Teorie ormonali: sostengono che il fattore di accrescimento del tumore può essere un'alterazione dell'asse ipofisi-androgeni-estrogeni. La terapia è, dove possibile, chirurgica; in alternativa si può ricorrere all'embolizzazione in corso di angiografia o, nei casi più estesi, alla radioterapia.

Comunque, l'eziopatogenesi della malattia resta tuttora sconosciuta e questo ha comportato la mancanza di una specifica terapia in grado di prevenirne l'insorgenza o di evitarne la recidiva post-chirurgica. L'assenza di validi bersagli terapeutici ha portato allo sviluppo di terapie empiriche, come la radioterapia. Poiché lo sviluppo e l'attività contrattile dei miofibroblasti sono stati considerati causa primaria e ricorrente dell'angiofibroma, sarebbero auspicabili terapie che interferiscono con le funzioni dei miofibroblasti stessi. Si è cercato a lungo di identificare trattamenti terapeutici che possano controllare il processo fibrotico

che conduce all'insorgenza della malattia, purtroppo senza buoni risultati. L'inflammazio-  
ne gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo della fibrosi, fatto confermato dalla presenza  
delle citochine proinfiammatorie. Nel processo di guarigione delle ferite si attiva il processo  
fibrotico attraverso la differenziazione dei fibroblasti in miofibroblasti la cui attività con-  
trattile è necessaria per il rimodellamento dei tessuti. In condizioni fisiologiche dopo la  
riparazione del danno i miofibroblasti vanno incontro ad apoptosi ad opera dell'FGF, con  
riduzione del numero di queste cellule, mentre, in condizioni patologiche, la loro attività  
contrattile persiste e porta alla deformazione tissutale. Allo scopo di poter evidenziare i  
meccanismi cellulari e molecolari che determinano lo sviluppo e la persistenza della ma-  
lattia, abbiamo posto sotto osservazione i tessuti e le linee cellulari fibroblastiche isolate  
dai tessuti di pazienti affetti da angiofibroma nasofaringeo e abbiamo evidenziato che i  
miofibroblasti rappresentavano il maggior numero di cellule presenti nei cordoni fibroma-  
tosi. La questione dell'origine miofibroblastica è strettamente correlata al problema della  
sua identificazione. Tre caratteristiche fondamentali a livello ultrastrutturale consentono  
di riconoscere i miofibroblasti dai fibroblasti quiescenti:

- fasci di miofilamenti contrattili;
- ampi siti di attacco cellula-matrice;
- aderenze intracellulari e giunzioni gap.

Un aumento di produzione della matrice extracellulare contribuisce in modo determinante  
al rimodellamento dei tessuti. I miofibroblasti sintetizzano vari componenti della matrice  
extracellulare che possono potenzialmente essere usati come markers molecolari. I prin-  
cipali costituenti della matrice extracellulare prodotti dai miofibroblasti sono collagene di  
tipo I, III, IV e V, prodotti anche da molte altre cellule. Nelle sindromi fibromatose circa la

metà dei fibroblasti differenzia in miofibroblasti, diversamente dalle cellule controllo in cui questa proteina è completamente assente. In seguito alla differenziazione in miofibroblasti avviene un aumento della deposizione di matrice extracellulare. Le varie fasi del processo che conduce alla formazione di tessuto fibroso sono regolate dai fattori di crescita, che risultano sovraespressi nei tessuti patologici dell'angiofibroma, come dimostrato nel nostro studio. Il fattore di crescita TGF- $\beta$ 1, presente nei tessuti del tumore, si lega al suo recettore TGFRII e questo determina la fosforilazione e il reclutamento del recettore eterodimerico TGF- $\beta$ 1 di tipo I (TGFRI). Questo recettore TGFRI porta alla fosforilazione e all'attivazione di SMAD2 e SMAD3, che si legano a SMAD4 e traslocano nel nucleo aumentando, insieme ad altri fattori trascrizionali, la trascrizione del gene che codifica per la proteina  $\alpha$ -SMA che induce alla differenziazione dei fibroblasti. Le citochine EGF e IGF-2 potenziano l'azione profibrotica di TGF- $\beta$ 1 e inducono la proliferazione dei fibroblasti. TGF- $\beta$ 1 può indurre un aumento di sintesi di collagene di tipo III e glicosaminoglicani, aumenta la formazione di tessuto di granulazione (fibrosi) e l'angiogenesi. Il tessuto di granulazione è formato da fibroblasti, miofibroblasti, componenti della matrice extracellulare e vasi neoformati. La ricca componente vascolare ed i mediatori vasoattivi provocano la formazione nel tessuto di granulazione di un ricco essudato infiammatorio che lo rende fortemente edematoso. Un approccio terapeutico per il trattamento dell'angiofibroma e per prevenire le sue recidive potrebbe quindi consistere nell'inibizione della proliferazione miofibroblastica indotta da TGF- $\beta$ 1 nelle prime fasi della malattia. Questo approccio terapeutico potrebbe essere realizzato solo dopo completa elucidazione dei meccanismi post-traduzionali attivati dal legame di TGF- $\beta$ 1 al suo recettore miofibroblastico. Un'altra componente della matrice extracellulare è la fibronectina, che gioca un ruolo fondamentale nella migrazione cellulare, adesione, morfologia cellulare e differenziazione dei miofibroblasti. Numerosi studi hanno

rilevato che questa molecola della matrice extracellulare è anch'essa sovraespressa ad opera del TGF- $\beta$ 1 nei fibroblasti "in vitro". Il fatto che i fattori di crescita, i miofibroblasti e la fibronectina siano tutti presenti insieme nello stesso tessuto conferma questa teoria. (Berndt A et al, 1995) Inoltre è stato dimostrato che TGF- $\beta$ 1 aumenta l'espressione degli enzimi tissutali(transglutaminasi)che inducono la reticolazione della fibronectina. Esiste un meccanismo a feedback positivo con autoinduzione di TGF- $\beta$ 1(Van Obberghen-Schilling e al, 1988) e inoltre l'ipossia locale indotta dalla fibrosi stimola ulteriormente l'espressione di TGF- $\beta$ 1(Falanga v et al, 1991) come anche la produzione di radicali liberi (Murrel GA, 1992; Murrel GA et al, 1989; Murrel GA et al, 1987).

Nel nostro lavoro sperimentale abbiamo evidenziato un'aumentata espressione di TGF- $\beta$ 1 nel citoplasma dei miofibroblasti e delle cellule endoteliali dei vasi; questa è la dimostrazione che questo fattore di crescita è implicato, oltre che nella differenziazione dei fibroblasti in miofibroblasti, anche nel processo della neoangiogenesi. Il TGF- $\beta$ 1 ha mostrato una distribuzione in granuli a livello citoplasmatico, dovuta probabilmente al fatto che il suo recettore, dopo il legame con il TGF- $\beta$ 1, viene internalizzato in vescicole endocitiche che sono interessate nel turnover recettoriale. Quindi, un'eventuale terapia potrebbe essere rivolta all'inattivazione dell'espressione di questo fattore di crescita mediante terapia genica locale e blocco del suo recettore o del segnale post-recettoriale. Anche l'applicazione locale di anticorpi anti-TGF $\beta$ 1 ha dimostrato la riduzione dei vasi sanguigni e della quantità di collagene e fibronectina (Shah m ET al, 1992). Nel nostro studio abbiamo messo in evidenza la presenza del fattore TNF- $\alpha$  a livello del tessuto fibroso e delle strutture vascolari dell'angiofibroma nasofaringeo. L'azione di questa citochina sembra essere correlata strettamente ai 2 recettori su cui si lega determinando effetti diversi: il legame con TNFR1 determina l'apoptosi (morte cellulare programmata) mentre legandosi a TNFR2 viene at-

tivata la proliferazione dei fibroblasti. È stato descritto che il TNF- $\alpha$  si comporta in modo diverso a seconda della sua concentrazione: ad alte concentrazioni esso tende ad inibire la contrazione dei miofibroblasti (Liaquat S et al, 2013), mentre a basse concentrazioni aumenta la loro contrazione (Verjee LS et al, 2009). Altri autori hanno dimostrato che la somministrazione sistemica del recettore TNFR1 solubile ridurrebbe la fibrosi polmonare indotta da bleomicina (grazie alla produzione del TNF- $\alpha$  che determina la sovraespressione di TGF- $\beta$ 1) in un modello sperimentale murino (Therrien FJ et al, 2012). Questo studio però va ripetuto su tessuti umani primari perché non tutti i ceppi murini hanno sviluppato la fibrosi polmonare dopo bleomicina. La diversa risposta di TNF- $\alpha$  sembra dipendere dal tipo e dal numero di recettori presenti nei miofibroblasti: TNFR1 viene espresso in modo costitutivo da vari tipi cellulari, mentre l'espressione endogena di TNFR2 è limitata a poche cellule tra cui quelle emopoietiche e quelle stromali mesenchimali. TNF- $\alpha$  potrebbe rappresentare un ipotetico bersaglio per la terapia dell'angiofibroma nelle sue fasi primarie o per la prevenzione delle recidive post-chirurgiche. Due farmaci anti-TNF $\alpha$  sono stati approvati dalla FDA, Adalimumab e Golimumab, che legano i recettori monomericici e trimericici della citochina provocando inibizione della contrazione dei miofibroblasti che avviene attraverso il disassemblaggio dell'apparato contrattile  $\alpha$ -SMA intracellulare. (Liaquat S, 2016). Nel nostro studio abbiamo dimostrato che il TNF- $\alpha$  era maggiormente localizzato nei fibroblasti patologici e dunque sembra essere direttamente coinvolto nel processo fibrotico, esclusivamente attraverso il suo recettore TNFR2, il quale viene espresso a massimi livelli in corso di patologie.

Nel nostro studio sperimentale abbiamo anche dimostrato l'espressione marcata di VEGF a livello dell'endotelio ghiandolare e a livello dell'epitelio vascolare nei tessuti dell'angiofibroma. Questo fattore di crescita angiogenetico induce la migrazione delle cellule endoteliali

che proliferano e formano nuovi capillari dai vasi pre-esistenti. I capillari penetrano nella matrice connettivale iniziale in via di formazione durante il processo di guarigione delle ferite, nella quale sono presenti anche i fibroblasti e i miofibroblasti, oltre al collagene immaturo, glucosaminoglicani, fibrina e fibronectina. Grazie all'angiogenesi abbiamo differenziazione, crescita tissutale e riparazione del danno, a livello fisiologico, mentre, a livello patologico, avviene la neoangiogenesi durante i processi ischemici, infiammatori e neoplastici. La proliferazione delle cellule contrattili è simile alla proliferazione fibroblastica durante la guarigione delle ferite e il rapporto tra collagene di tipo III e collagene di tipo I è aumentato in entrambi i processi. In condizione di ipossia si attivano HIF- $\alpha$  (fattore di trascrizione alfa inducibile da ipossia) e VEGF, insieme ai loro recettori, i quali partecipano ai processi fibrotici (Ferrara N et al, 2003, Folkman J, 2006). VEGF e il suo recettore sarebbero mediatori chiave nello sviluppo vascolare embrionale e nell'angiogenesi patologica (oltre a quella fisiologica) che ha un ruolo fondamentale nell'evoluzione della malattia attivando i fibroblasti e i miofibroblasti. In condizioni patologiche, come nell'angiofibroma, l'attività contrattile dei miofibroblasti persiste e sono stati dimostrati livelli elevati di VRGF e questo significa che il tessuto permane vascolarizzato. Nella fase involuzionale della malattia sono presenti cordoni attivi con noduli ricchi di miofibroblasti, ed è presente una forte espressione del recettore VEGFR2 e di HIF- $\alpha$ , mentre c'è un'espressione molto debole di VEGF e del suo recettore VEGFR1, che sono molto espressi in condizioni patologiche avanzate. Nella fase residuale inattiva sono presenti aree ricche di fibre collagene e fibroblasti. Il tasso di recidiva in seguito ad intervento chirurgico potrebbe essere posto in correlazione con un'incompleta rimozione dei noduli ricchi di miofibroblasti attivi. A livello terapeutico, per impedire la progressione della malattia e per evitare recidive, si potrebbe prospettare l'uso di farmaci anti-VEGF ottenendo un'inibizione dei noduli miofibroblastici

e della neovascolarizzazione, fattori che innescano l'angiofibroma e lo fanno progredire.

## Capitolo 7

### Conclusioni

In base ai dati riportati in letteratura l'arteriografia seguita da embolizzazione preoperatoria e resezione chirurgica è il trattamento di scelta per l'angiofibroma rinofaringeo. Tuttavia, le attuali terapie chirurgiche e non chirurgiche sono spesso inefficaci e non conducono alla risoluzione definitiva della malattia portando a frequenti recidive post-chirurgiche. Numerosi lavori hanno dimostrato la sovraespressione dei fattori trofici pro-infiammatori e angiogenici a livello di tessuti patologici asportati da tumori del distretto testa-collo e si può ipotizzare che essi potrebbero essere la causa primaria di insorgenza e progressione della malattia. Il nostro studio sperimentale ha mostrato, grazie all'immunoistochimica, la presenza dei fattori trofici VEGF, TGF- $\beta$ 1 e TNF- $\alpha$  nei tessuti dell'angiofibroma mettendoli pertanto in correlazione con l'inizio della malattia e con il suo progredire. I risultati sperimentali suggeriscono una possibile applicazione di questi fattori pro-infiammatori nell'identificare il grado di progressione della malattia e come fattori prognostici nel follow-up di pazienti sottoposti a rimozione chirurgica dell'angiofibroma.

Inoltre, essi potrebbero essere considerati come i principali targets terapeutici. Lo sviluppo di inibitori sintetici di questi fattori pro-infiammatori e pro-angiogenetici potrebbe inibire

l'intensità del processo infiammatorio e la neoangiogenesi inibendo così a monte l'insorgenza della malattia. Terapie innovative potrebbero essere individuate nell'uso combinato di inibitori specifici dei fattori TNF- $\alpha$ , VEGF e TGF- $\beta$ 1 e dei loro recettori così da inibire la progressione della patologia attraverso l'inattivazione del processo che conduce alla fibrosi e alla formazione di nuovi vasi. Tuttavia, in base ai dati emersi dal nostro studio, non si è ancora in grado di affermare con certezza il ruolo diretto dei fattori di crescita nell'etiopatogenesi e nella fisiopatologia dell'angiofibroma nasofaringeo, perché sono necessari nuovi studi di approfondimento sul nesso tra infiammazione ed insorgenza della patologia e ulteriori analisi cliniche e sperimentali atte a proporre nuovi modelli interpretativi riguardanti la malattia. Ulteriori studi sperimentali dovranno evidenziare il ruolo funzionale dei fattori di crescita nella differenziazione e nella regolazione della crescita delle cellule fibroblastiche dell'angiofibroma nasofaringeo. Dato il ristretto numero di casi analizzati e la scarsa presenza di dati significativi in letteratura è sicuramente necessaria una casistica più ampia per trarre delle conclusioni definitive.

## Capitolo 8

### Bibliografia

- Stazi et al. Dissecting the role of novel EZH2 inhibitors in primary glioblastoma cell cultures: effects on proliferation, epithelial-mesenchymal transition, migration, and on the pro-inflammatory phenotype *Clinical Epigenetics* (2019) 11:173
- M. Spoletini et al. Trophic and neurotrophic factors in human pituitary adenomas (Review). *International Journal of Oncology* 51: 1014-1024, 2017
- S. Taurone, E. Bianchi, G. Attanasio et al. Immunohistochemical profile of cytokines and growth factors expressed in vestibular schwannoma and in normal vestibular nerve tissue. *Molecular Medicine Reports*
- S. Taurone, F. Galli, A. Signore et al. VEGF in nuclear medicine: Clinical application in cancer and future perspectives (Review). *International Journal of Oncology* 49: 437-447, 2016
- Samanta Taurone, Marialuisa Spoletini, Caterina Chiappetta et al. Brain gliomas and growth factors: immunohistochemical, immunofluorescence, flow cytometry and RT-PCR profile in pediatric age

- M. Artico et al. Immunohistochemical Profile of Neurotrophins and MIB-1 in jugulotympanic paragangliomas: prognostic value and review of the literature. *International Journal of Immunopathology and pharmacology*. Vol. 25, no. I, 183-191 (2012)
- Nada Ali Alshaikh et al. Juvenile nasopharyngeal angiofibroma staging: an overview. *Ear Nose Throat j*. 2015 JUN; 94(6): e 12-22
- Yiotakis I et al. Juvenile nasopharyngeal angiofibroma stages I and II: a comparative study of surgical approaches. *Int J Pediatr. Otorhinolaryngol*. 2008 Jun;72(6):793-800
- Wanpeng Li et al. Current perspectives on the origin theory of juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Discov Med* 2019 Jun; 27(150):245-254
- Juan Francisco Oré Acevedo Juvenile nasopharyngeal angiofibroma surgical treatment in paediatric patients *Acta Otorrinolaringol Esp* Sep-oct 2019;70(5): 279-285
- J Zito et al. Juvenile nasopharyngeal angiofibroma *J La State Med Soc*. 2001 Aug;153(8):395-8.
- McGarey PO Jr et al. Juvenile angiofibroma in a 32 years old man 2018 Feb *BMJ Case Rep*. 8;2018: bcr2017222763
- Pamuk AE et al. Juvenile nasopharyngeal angiofibroma; a single centre's 11-year experience *J Laringol Otol*. 2018 Nov;132(11):978-983
- P Ryan Camilon et al. Juvenile nasopharyngeal angiofibroma in prepubertal males: A diagnostic dilemma *Laryngoscope* 2019 Aug;129(8):1777-1783

- Satvinder S Bakshi et al. Juvenile Nasopharyngeal Angiofibroma J Pediatr Hematol Oncol. 2016 Aug;38(6):491-2.
- Wiesław Gołąbek et al. Juvenile nasopharyngeal angiofibroma with intracranial extension - diagnosis and treatment Otolaryngol Pol. 2019 Oct 24;74(2):1-7
- Sofia Sousa et al. Juvenile nasopharyngeal angiofibroma: A retrospective study of 27 cases in the ENT department of IPO-PORTO Clin Otolaryngol.2019 May;44(3):456-460
- Richard Douglas et al. Endoscopic surgery for juvenile nasopharyngeal angiofibroma: where are the limits? Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg .2006 Feb;14(1):1-5
- Derek J Rogerset al. Endoscopic resection of juvenile nasopharyngeal angiofibroma Adv Otorhinolaryngol 2012; 73:132-6.
- Kares S Fernandez et al. Sirolimus for the treatment of juvenile nasopharyngeal angiofibroma Pediatr Blood Cancer 2020 Apr;67(4): e28162.
- Patrick M Spielmann et al. Juvenile nasopharyngeal angiofibroma: spontaneous resolution Ear Nose Throat 2008 Sep;87(9):521-3.
- Anupam Mishra et al.True bilateral nasopharyngeal angiofibroma: report and review Eur Arch Otorhinolaryngol 2016 Oct;273(10):3435-8
- H Martin et al. Juvenile Nasopharyngeal Angiofibroma Ann. Surg.1948 Mar;127(3):513-36
- Andrew J Maroda et al. Trimodal embolization of juvenile nasopharyngeal angiofibroma with intracranial extension Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2020 Mar; 130:109805

- Patil Karthikeya Juvenile nasopharyngeal angiofibroma Indian J Dent Res Jan-Mar 2005;16(1):22-6
- Anna Szymanska et al. Invasive growth patterns of juvenile nasopharyngeal angiofibroma: radiological imaging and clinical implications Acta Radiol. 2014 Jul;55(6):725-31
- Adam M Zanation et al. Endoscopic skull base techniques for juvenile nasopharyngeal angiofibroma Otolaryngol Clin North Am. 2012 Jun;45(3):711-30
- Nadim Khoueir et al. Exclusive endoscopic resection of juvenile nasopharyngeal angiofibroma: a systematic review of the literature Otolaryngol Head Neck Surg . 2014 Mar;150(3):350-8
- Yutaka Hanamura et al. Juvenile nasopharyngeal angiofibroma: stage and surgical approach. 2005 Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho .2005 May;108(5):513-21
- Gheorghe Iovanescu et al Juvenile nasopharyngeal angiofibroma: Timisoara ENT Department's experience. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2013 Jul;77(7):1186-9
- Christina Bales et al. Craniofacial resection of advanced juvenile nasopharyngeal angiofibroma Arch Otolaryngol Head Neck Surg .2002 Sep;128(9):1071-8.
- M S Marek et al. Malignant transformation of a nasopharyngeal angiofibroma Laryngoscope 1989 Oct;99(10 Pt 1):1088-92
- Habib G Zalzal et al. Robotic-assisted transmaxillary approach for removal of juvenile nasopharyngeal angiofibroma of the pterygopalatine and infratemporal fossa Head Neck 2020 Sep;42(9):2745-2749.

- J P Windfuhr et al. Extranasopharyngeal angiofibroma revisited Clin. Otolaryngol. 2018 Feb;43(1):199-222.
- Colin D Mc Knight et al. Reassessing the Anatomic Origin of the Juvenile Nasopharyngeal Angiofibroma J Comput Assist Tomogr Jul/Aug 2017;41(4):559-564
- Jaimie Doody et al. The Genetic and Molecular Determinants of Juvenile Nasopharyngeal Angiofibroma: A Systematic Review Ann Otol Rhinol Laryngol 2019 Nov;128(11):1061-1072
- Y F Wang Nasopharyngeal angiofibroma Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei) .2001 Jan;64(1):39-46
- B Guertl et al. Nasopharyngeal angiofibroma: an APC-gene-associated tumor Hum Pathol. 2000 Nov;31(11):1411-3
- Samuel C Leong A. systematic review of surgical outcomes for advanced juvenile nasopharyngeal angiofibroma with intracranial involvement
- P A Dibble et al. Juvenile nasopharyngeal angiofibroma Laryngoscope 1962 Feb; 72:218-31
- G B Singh et al. A rare case of extra-nasopharyngeal angiofibroma of the septum in a female child J Laryngol. Otol. 2018 Feb;132(2):184-187
- Andrew H Marshall et al Management dilemmas in the treatment and follow-up of advanced juvenile nasopharyngeal angiofibroma ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 2006;68(5):273-8
- Zhuofu Liu et al. The risk factors for residual juvenile nasopharyngeal angiofibroma and the usual residual sites Am J Otolaryngol. May-Jun 2019;40(3):343-346

- V Pino Rivero et al. Nasopharyngeal angiofibroma. Our experience (1990-2001) An Otorrinolaringol Ibero Am 2003;30(3):257-64
- V Urbain e. al. About Juvenile Nasopharyngeal Angiofibroma Rev Med Liege 2015 Sep;70(9):461-4
- Renguang Pei et al. Efficacy and safety of preoperative internal maxillary arterial embolization with gelfoam for nasopharyngeal angiofibroma Eur Arch Otorhinolsryngol.2019 Mar;276(3):865-869
- Ami Amini-Salari Mandibular Intraosseous Angiofibroma-A Rare Clinical Entity J Oral Maxillofacial Surg. 2020 Aug;78(8):1343-1348
- Tobias Alecio Mattei et al. Juvenile nasopharyngeal angiofibroma with intracranial extension Otolaryngol Head Neck Surg 2011 Sep;145(3):498-504
- Thuesen AD et al. Juvenile angiofibroma 2005 Aug 22;167(34):3163-6 Ugeskr Laeger
- Korcum AF et al. Treatment modalities of nasopharyngeal angiofibroma Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg. Jul-Aug 2008;18(4):263-7
- Akasaka Y, Ono I, Tominaga A, et al. Basic fibroblast growth factor in an artificial dermis promotes apoptosis and imhibits expression of alpha-smooth muscle actin leading to reduction of wound contraction. Wound Repair Regen, 2007; 15(3):378-389.
- Apostolaki M, Armaka M, Victoratos P, Kollias G. Cellular mechanisms of TNF function in models of inflammation and autoimmunity. Curr Dir Autoimmun, 2010;11:1-26.

- Balza E, Borsi L, Allemanni G, Zardi L. Transforming growth factor beta regulates the levels of different fibronectin isoforms in normal human cultured fibroblasts. *FEBS Lett*, 1988; 228(1):42-44.
- Bertelli R, Valenti F, Oleggini R, et al. Cell-specific regulation of alpha1(III) and alpha2(V) collagen by TGF-beta1 in tubulointerstitial cell models. *Nephrol Dial Transplant*, 1998; 13(3):573-579.
- Branton MH, Kopp JB. TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect*, 1999; 1: 1349
- Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, 2002; 296:1634- 1635
- Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 2003; 425(6958): 577-584.
- Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*, 1993; 122: 103-111.
- Falanga V, Qian SW, Danielpour D, Katz MH, Roberts AB, Sporn MB. Hypoxia upregulates the synthesis of TGF-beta1 by human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 1991; 97(4):634-7.
- Falvo JV, Tsytsykova AV, Goldfeld AE. Transcriptional control of the TNF gene. *Current Dir Autoimmun*, 2010;11:27-60.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 2003; 9 (6):669-76.

- Fukada T, Hibi M, Yamanaka Y, et al. Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity*, 1996; 5(5):449-460.
- Grotendorst GR, Rahmanie H, Duncan MR. Combinatorial signalling pathway determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *Faseb J*, 2004; 18(3):469-79.
- Haase VH. Pathophysiological consequences of HIF activation: HIF as a modulator of fibrosis. *Ann NY Acad Sci*, 2009; 1177:57-65.
- Ignatz RA, Massagué J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem*, 1986; 261(9):4337-4345.
- Ignatz RA, Massagué J. Type beta transforming growth factors controls the adipogenic differentiation of 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82(24): 8530-8534.
- Ishida W, Mori Y, Lakos G, et al. Intracellular TGF-beta receptor blockade abrogates Smad-dependent fibroblast activation in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol*, 2006; 126(8):1733-1744.
- Jacobs M, Samarina A, Grivennikov S, et al. Reactivation of tuberculosis by tumor necrosis factor neutralization. *Eur Cytokine Netw*, 2007;18 (1):5-13.
- Kagami S, Kuhara T, Yasutomo K, et al. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) stimulates the expression of beta 1 integrins and adhesion by rat mesangial cells. *Exp Cell Res*, 1996; 229(1): 1-6.

- Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslari E, Kioussis D, Kollias G. Transgenic mice expressing human tumor necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J*, 1991; 10(13):4025-4031.
- Liu X. Inflammatory cytokines augments TGFbeta1-induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cells by up-regulating TbetaR-I. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2008; 65(12): 935-944.
- Lockett-Chastain LR, Gallucci RM. Interleukin (IL)-6 modulates transforming growth factor -beta expression in skin and dermal fibroblasts from IL-6- deficient mice. *Br J Dermatol*, 2009; 161(2): 237-248.
- Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 2003;114(2):181-190.
- Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, et al. Transforming growth factor type B: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci*, 1986; 83(12): 4167-4171.
- Roberts CJ, Birkenmeier TM, McQuillan JJ, et al. Transforming growth factor beta stimulates the expression of fibronectin and of both subunits of the human fibronectin receptor by cultured human lung fibroblasts. *J Biol Chem*, 1988; 263(10):4586-4592.
- Theiss AL, Simmons JG, Jobin C, Lund PK. Tumor Necrosis Factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *J Biol Chem*, 2005; 280(43): 36099-36109.

- Ye H, Cai PC, Zhou Q, Ma WL. Transforming growth factor-1 suppresses the up-regulation of matrix metalloproteinase-2 by lung fibroblasts in response to tumor necrosis factor-. *Wound Repair Regen*, 2011; 19(3):392-399.
- Carmen Stanca Melincovici et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(2):455-467
- Peter Carmeliet VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer *Oncology* 2005;69 Suppl 3:4-10
- Ken Matsumoto Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours *J Biochem* 2014 Jul;156(1):1-10.
- Kodappully Sivaraman Siveen Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Signaling in Tumour Vascularization: Potential and Challenges *Curr Vasc Pharmacolog*. 2017;15(4):339-351.