



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA  
DIPARTIMENTO DI CHIRURGIA

SCUOLA DI DOTTORATO DI  
SCIENZE BIOMEDICHE E TRASLAZIONALI

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE CHIRURGICHE E DELLE MALATTIE  
EPATOBILIARI E PANCREATICHE

CICLO /ANNO (1° anno d'Iscrizione) XXIV ciclo / 2009

TESI DI DOTTORATO  
MUC 5AC: NUOVO MARKER SIERICO  
NEL COLANGIOCARCINOMA INTRAEPATICO E PERI-ILARE

S.S.D. MED/18

Coordinatore: Prof. CLAUDIO BASSI

Tutor: Prof. ALFREDO GUGLIELMI

Dottorando: Dott. ANDREA RUZZENENTE

## **Abstract**

**Background and aims:** cholangiocarcinoma is the second more frequent primary neoplasm of the liver. Surgical resection is still the only therapy that can achieve good long-term results. Diagnosis and prognostic stratification are the two most debated issues in the surgical treatment of this disease. MUC 5AC is a mucinous protein that is expressed by different human tissues and had been identified in different epithelial cancers.

The aim of this study was to investigate the role of serum assessment of MUC 5AC in a group of patients with intrahepatic and peri-hilar cholangiocarcinoma. The diagnostic role compared to CA 19.9 and CEA and the prognostic role in patients submitted to surgical resection were investigated.

**Patients and methods:** 69 patients with cholangiocarcinoma, biliary lithiasis and hepatolithiasis, other primary and secondary liver cancers and a group of control subjects were included into this study.

Serum assessment of MUC 5AC was performed with ELISA method.

**Results:** Serum MUC 5AC was significantly higher in patients with cholangiocarcinoma compared to biliary lithiasis, hepatolithiasis, other primary or secondary liver tumors and control subjects. The diagnostic value of serum MUC 5AC was investigated with ROC curve analysis.

The AUC of serum MUC 5AC for the diagnosis of cancer was significantly higher compared to CA 19.9 and CEA. In cholangiocarcinoma' patients the serum values of MUC5AC was significantly higher in patients with metastatic disease (stage TNM IVb). The survival after surgical resection was higher in patients with serum MUC 5AC < 13 ng/ml.

## **Conclusions**

Serum MUC 5AC proved to be useful as diagnostic tool for identification of cholangiocarcinoma. The diagnostic value of MUC 5AC proved to be higher compared to CA 19.9 and CEA. Moreover serum MUC 5AC proved to have prognostic value with relationship with tumor stage and survival.

**INDICE**

	N pag.
- INTRODUZIONE	3
- MATERIALI E METODI	34
- RISULTATI	37
- DISCUSSIONE	44
- CONCLUSIONI	46
- BIBLIOGRAFIA	47

## **INTRODUZIONE**

### **Definizioni**

Il colangiocarcinoma (CC) è un tumore maligno che origina dalle cellule epiteliali della via biliare. È il secondo tumore primitivo del fegato per incidenza. Il tipo istologico più comune è l'adenocarcinoma<sup>1</sup>. Viene classificato in base alla sua sede anatomica d'insorgenza in intraepatico ed extraepatico<sup>2</sup>. Si considera intraepatico (o periferico) un colangiocarcinoma che insorge nel parenchima epatico oltre le ramificazioni biliari di secondo ordine. Si considera extraepatico quando insorge nelle parti più distali della via biliare.

Il CC nella maggior parte dei casi insorge dal tratto extraepatico dell'albero biliare; il 50-60% del totale sono tumori che interessano la biforcazione biliare detti colangiocarcinomi ilari o di Klatskin. Nel 20-30% dei casi la neoplasia si sviluppa nel tratto medio-distale della via biliare e solo un 10% origina a livello intraepatico<sup>3,4</sup>.

Sono state recentemente definite come perilari le neoplasie intraepatiche o extraepatiche che coinvolgono la biforcazione biliare. Questi tumori possono avere un maggior sviluppo intraepatico, extraepatico o misto<sup>5</sup>.

#### **Colangiocarcinoma intraepatico (ICC)**

Il colangiocarcinoma intraepatico insorge dalle vie biliari intraepatiche oltre la biforcazione dei rami biliari di secondo ordine<sup>6</sup>.

La forma intraepatica del colangiocarcinoma si presenta spesso come una lesione formante massa all'interno del fegato.

Esistono tre modalità di crescita per l'ICC. Sono state descritte nel 1997 dal Liver Cancer Study Group of Japan (LCSGJ), che ha identificato tre tipi di colangiocarcinoma intraepatico in base al tipo di crescita macroscopica: mass forming (MF), periductal infiltrating (PI), intraductal growing (IG). I tumori MF hanno crescita nodulare e un margine ben definito rispetto al parenchima circostante; i PI non hanno una massa ben distinta e hanno una diffusa crescita neoplastica di tipo infiltrativo lungo l'asse degli spazi portali; infine, le forme IG hanno crescita papillare all'interno di un dotto biliare e perciò possono occluderlo e anche dilatarlo. Le forme miste sono classificate specificando i diversi tipi macroscopici maggiormente rappresentati (tipo MF+PI)<sup>7</sup> (Fig. 1).

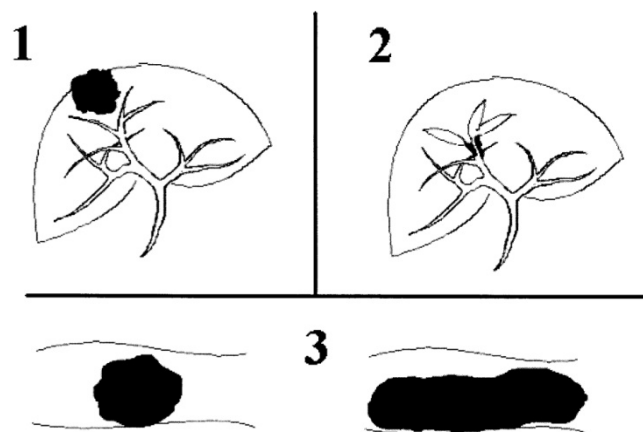


Fig. 1. I tre principali tipi di crescita macroscopica dell'ICC. 1 mass forming; 2 periductal infiltrating; 3 intraductal growing.

Colangiocarcinoma peri-ilare (PCC)

Sono definiti come peri-ilari i colangiocarcinomi che coinvolgono la biforcazione biliare. Questi tumori possono avere un maggior sviluppo intraepatico od extraepatico<sup>4</sup>.

La maggior parte dei colangiocarcinomi peri-ilari infiltra e prolifera lungo i dotti biliari extraepatici, che possono essere occlusi e dilatati.

Per il colangiocarcinoma peri-ilare sono state individuate tre modalità di crescita macroscopica: sclerosante, nodulare e papillare. La forma sclerosante è la più frequente, rappresentando il 70% dei casi mentre la forma papillare costituisce solo il 4-5% del totale. La forma sclerosante si presenta come un ispessimento circonferenziale della parete della via biliare accompagnato da un'importante reazione fibrotica e desmoplastica. La forma nodulare si presenta normalmente come una massa solida che protrude nel lume biliare ed è associata a infiltrazione. Il tipo papillare è rappresentato da un tessuto soffice e friabile che occupa il lume biliare<sup>8-10</sup>.

### **Epidemiologia e fattori di rischio**

Il colangiocarcinoma è il secondo tumore epatico primitivo in ordine di frequenza dopo l'epatocarcinoma (HCC). Costituisce il 3% del totale delle neoplasie gastrointestinali. L'epoca di presentazione più frequente è la VI-VII decade, con una leggera predisposizione per il sesso maschile<sup>3,11</sup>. Non sembra invece esserci una chiara predisposizione razziale<sup>3,12</sup>.

L'incidenza registrata negli USA è di 1-2 casi per 100.000 abitanti, con 3500 nuovi casi l'anno<sup>3,12</sup>. I tassi più alti d'incidenza sono nel Sud-Est asiatico (Thailandia, Cambogia, Laos), dovuti alla maggior presenza di fattori di rischio<sup>11</sup>.

Da studi autoptici, la prevalenza del CC è stimata tra lo 0,01%-0,5%. Il tasso di mortalità ha un andamento parallelo con quello dell'incidenza, quindi, la prevalenza di tale tumore è relativamente stabile<sup>2</sup>.

L'incidenza e la mortalità della forma intraepatica sono in aumento in tutto il mondo. Tale incremento è stato evidenziato sia nei Paesi industrializzati che nei Paesi in via di sviluppo. Le ragioni precise di questo aumento rimangono ancora sconosciute<sup>2</sup>, ma non sembra essere un artefatto dovuto al miglioramento delle capacità diagnostiche o ai cambiamenti nelle classificazioni; l'eterogeneità di questo incremento sembra rispecchiare un reale aumento di incidenza<sup>13,14</sup>.

Al contrario, il tasso di mortalità per il colangiocarcinoma extra-epatico ha mostrato negli ultimi anni un trend discendente nella maggior parte dei paesi<sup>15</sup>.

I fattori di rischio per lo sviluppo del CC sono: le anomalie congenite del tratto biliare, la colangite sclerosante primitiva, l'epatolitiiasi, le infezioni parassitarie, lo stato di portatore cronico dell'infezione tifoide, l'adenoma biliare, la papillomatosi biliare, le cisti congenite dell'albero biliare, la malposizione pancreatico biliare, tossine ambientali (tabacco, diossina, cloruro di vinile). L'aspetto che accumuna queste condizioni è rappresentato dall'infiammazione biliare<sup>16-21</sup>.

Recentemente, uno studio realizzato negli Stati Uniti ha incluso l'epatite cronica virale, la cirrosi e l'abuso di alcol tra i fattori di rischio per il CC nei pazienti più anziani. Tuttavia, la maggior parte dei pazienti non possiede alcuna condizione classica predisponente per il tumore<sup>22</sup>.

## DIAGNOSI

Il CC intraepatico si presenta più frequentemente senza sintomi specifici; si può avere dolenzia in sede addominale, perdita di peso, malessere e anoressia. In alcuni casi, l'unico reperto può essere una massa addominale riscontrata casualmente durante esami radiologici. Agli esami di laboratorio si evidenziano valori di fosfatasi alcalina moderatamente elevati e livelli di bilirubina nella norma. Si possono inoltre riscontrare aumenti del CA 19.9<sup>23,24</sup>.

Il colangiocarcinoma peri-ilare si può presentare con i classici segni di colestasi (ittero, urine scure, feci acromiche, prurito, malessere e perdita di peso); può, inoltre, presentarsi con colangiti e con formazione di ascessi intraepatici.

Le indagini di laboratorio rivelano un aumento della fosfatasi alcalina, della gamma-glutamyl-trasferasi e della bilirubina. L'ostruzione dei dotti biliari principali può causare un aumento del tempo di protrombina e una riduzione dell'apporto delle vitamine liposolubili. Nelle forme avanzate, l'albumina può ridursi, per compromissione della sintesi epatica, dovuta al fatto che il parenchima epatico è sostituito dal tumore<sup>23,24</sup>.

Il più importante marker tumorale è la glicoproteina CA 19.9, che aumenta nell'85% dei pazienti<sup>23-24</sup>. Possono, inoltre, essere elevati il CEA (nel 30% dei casi) e il CA 125 (nel 40-50% dei pazienti).

L'ecografia dell'addome è la prima indagine che mette in luce la presenza del tumore, tramite la visione diretta della massa neoplastica (che risulta ipoecogena) nell'ICC; nel PCC può evidenziare direttamente la lesione e/o i suoi effetti indiretti (dilatazione delle vie biliari a monte).



L'indagine di maggiore rilievo per la diagnosi di CC è la TC: essa evidenzia la localizzazione del tumore, l'eventuale multifocalità della lesione, la presenza di invasione vascolare venosa/arteriosa, la presenza di linfadenopatie e di metastasi a distanza<sup>25,26</sup>.

La RMN è importante nel valutare la presenza di noduli satelliti, l'atrofia lobare, l'estensione del coinvolgimento della via biliare principale. L'angi-RMN permette di evidenziare la presenza di un coinvolgimento vascolare; inoltre la CW-RMN permette la valutazione dell'infiltrazione della via biliare nei casi di PCC<sup>26</sup>.

Per una valutazione preoperatoria della crescita lungo la via biliare principale e delle metastasi linfonodali, nei casi di PCC può essere efficace l'ecoendoscopia (EUS)<sup>27-28</sup>.

Nel PCC è importante la valutazione dell'infiltrazione dei dotti biliari; inoltre, la presenza di ittero e colangiti, rende necessario drenare la via biliare. Questo duplice obiettivo può essere ottenuto con l'ERCP e la colangiografia percutanea trans epatica (PTC).

La PET ha ancora un ruolo limitato nella diagnosi, a causa delle basse sensibilità e specificità. Tuttavia, può essere utile per ricercare disseminazioni metastatiche della malattia<sup>29</sup>.

## FATTORI PROGNOSTICI

### Fattori prognostici del colangiocarcinoma intraepatico

#### 1. Modalità di crescita

La modalità di crescita macroscopica dell'ICC (MF, PI, IG) riflette diversità di comportamento biologico e di diffusione neoplastica.

Il tipo MF è il più frequente (60-70% dei casi)<sup>39-40</sup>; è associato ad una invasione portale precoce nel 45% dei casi; sono presenti, inoltre, noduli satelliti nel 36% dei casi<sup>41-43</sup>. Il coinvolgimento linfonodale è presente in circa il 30% dei pazienti<sup>44</sup>. La sopravvivenza a 5 anni riportata in letteratura varia tra il 25% il 48%.

Il tipo di crescita IG rappresenta una percentuale tra l'8% e il 23% degli ICC resecati. Ha un aspetto papillare ed è ben differenziato nella maggior parte dei casi; ha una bassa frequenza di invasione linfonodale, vascolare e perineurale<sup>45-48</sup>. La sopravvivenza a lungo termine dei soggetti con IG-ICC dopo resezione chirurgica è buona, con una sopravvivenza a 5 anni tra il 41% e l'80%. La sopravvivenza dei pazienti con la malattia di tipo IG è significativamente più lunga rispetto ai pazienti con le tipologie MF e PI, anche nei casi di metastasi linfonodali<sup>45-48</sup>.

Il tipo PI ha una prognosi peggiore di quella degli altri due tipi. Questa forma si riscontra dal 15% e al 35% dei casi e si associa ad infiltrazione biliare, vascolare e linfatica in corrispondenza dell'ilo epatico. La sopravvivenza a 5 anni in questi pazienti va dallo 0% al 49%.<sup>43,49-51</sup>

La forma mista MF+PI si riscontra nel 25%-45% dei pazienti. Questa forma ha una prognosi peggiore perché si presenta alla diagnosi con uno stadio di malattia più avanzato; inoltre ha una più elevata frequenza di metastasi linfonodali così come di invasione vascolare e di metastasi intraepatiche. La sopravvivenza a lungo termine è scarsa, con meno del 10% dei pazienti in vita a 5 anni<sup>43,52,53</sup>.

La tipologia di crescita è correlata in modo significativo con la sede della neoplasia; le neoplasie in sede periferica sono soprattutto di tipo MF, mentre quelle situate centralmente sono soprattutto di tipo PI. Il tipo PI ha un comportamento biologico più aggressivo e, quindi, l'esito a lungo termine è significativamente peggiore nei pazienti con CC in sede centrale<sup>53</sup>.

## 2. Estensione locale (categoria T)

L'estensione locale della neoplasia è correlata a: dimensioni, multifocalità, invasione vascolare, invasione della via biliare principale.

Le dimensioni del tumore sono importanti nel determinare la prognosi dei pazienti: infatti la sopravvivenza a 5 anni nei pazienti con neoplasia <3 cm è del 42%, mentre nei pazienti con neoplasia >6 cm crolla allo 0%<sup>49</sup>.

I noduli satelliti, in letteratura, sono stati riscontrati nel 20-30% dei pazienti. La sopravvivenza a 5 anni dei pazienti con multifocalità è tra il 7% e lo 0%<sup>43,49,51</sup>.

L'infiltrazione portale è un importante fattore prognostico negativo per gli ICC; infatti, la sopravvivenza è significativamente maggiore nei pazienti senza coinvolgimento portale rispetto a coloro che hanno un'infiltrazione

portale macroscopica, con sopravvivenza a 3 anni rispettivamente del 46% e dello 0%<sup>54</sup>.

### 3. Coinvolgimento linfonodale (categoria N)

Nelle casistiche in letteratura, la presenza di metastasi linfonodali varia dal 7% al 73%; i pazienti con N+ hanno una sopravvivenza a 5 anni tra lo 0% e il 17%<sup>41,53,55-57</sup>.

La frequenza di coinvolgimento linfonodale nelle forme IG è significativamente più bassa rispetto alle altre forme, mentre nel tipo misto MF+PI è significativamente più elevata: secondo alcune casistiche, non supera il 20% nel primo caso, mentre arriva anche all'80% nel secondo caso.

L'interessamento linfonodale è legato allo stadio di malattia e, secondo alcuni studi, è presente fin nell'80% dei pazienti con malattia in stadio T4 (5a ed. della classificazione TNM dell'UICC/AJCC)<sup>58</sup>.

La frequenza di metastasi linfonodali è legata, inoltre, alla sede del tumore: è maggiore nelle neoplasie con sviluppo centrale rispetto a quelle con crescita periferica (75 vs. 45% secondo alcuni studi)<sup>53</sup>.

### 4. Pattern biologico macro- e microscopico

Gli aspetti istologici principalmente connessi alla prognosi sono: la differenziazione cellulare, l'invasione vascolare linfatica e perineurale.

Per quanto riguarda la differenziazione cellulare, le neoplasie ben o moderatamente differenziate hanno una prognosi migliore rispetto a quelle

scarsamente differenziate. La sopravvivenza è rispettivamente del 50%, 39% e 0% a 5 anni per le forme ben, moderatamente o scarsamente differenziata<sup>52</sup>.

L'invasione linfatica rappresenta un fattore prognostico negativo per la sopravvivenza: in letteratura, nessuno dei pazienti con coinvolgimento linfatico supera i 3 anni di sopravvivenza, mentre sono riportate sopravvivenze a 5 anni del 70% in pazienti senza invasione linfatica<sup>59</sup>.

Secondo alcuni studi, i pazienti con invasione perineurale hanno una sopravvivenza a 5 anni inferiore al 10%, mentre essa supera il 60% nei pazienti senza questo coinvolgimento. Inoltre, l'invasione perineurale è associata ad un'elevata frequenza di metastasi linfonodali e alla presenza di invasione vascolare<sup>60</sup>.

Per l'ICC sono stati identificati molti fattori prognostici biologici e molecolari. Una ridotta espressione di IL-6 e di p27kip1, mutazioni di k-ras, di p53, E-caderina,  $\alpha$ -catenina e  $\beta$ -catenina sono associate con neoplasie in stadio avanzato, scarsamente differenziate e con rapida progressione<sup>61</sup>.

## **Fattori prognostici del PCC**

### **1. Modalità di crescita**

Le diverse modalità di crescita macroscopica del PCC (sclerosante, nodulare, papillare) rispecchiano un differente comportamento biologico. Secondo alcuni studi, la forma papillare si associa spesso a stadi precoci di malattia; nel 70% dei casi si tratta, infatti, di neoplasie con stadio

inferiore allo stadio IIA della classificazione TNM UICC/AJCC 6a ed. Inoltre, le metastasi linfonodali si riscontrano in meno del 5% dei PCC papillari; queste forme si associano ad una prognosi migliore rispetto alle forme nodulare e sclerosante, con un sopravvivenza media di 55 mesi vs. 33<sup>62</sup>.

## 2. Estensione locale (categoria T)

La 6a edizione della classificazione TNM UICC/AJCC prende in considerazione una neoplasia che all'inizio è limitata all'interno del dotto biliare (stadio T1), per arrivare poi a coinvolgere gli organi circostanti o i rami principali della vena porta o dell'arteria epatica comune bilateralmente (stadio T4). In letteratura, le neoplasie T1 hanno una sopravvivenza a 5 anni del 60%; la prognosi peggiora nelle neoplasie T2 e T3 che hanno una sopravvivenza riportata simile, con aspettativa di vita a 5 anni del 30% circa. Le neoplasie T4 hanno, infine, sopravvivenza a 5 anni inferiore al 15%<sup>63</sup>.

## 3. Coinvolgimento linfonodale (categoria N)

Le metastasi linfonodali sono presenti nel 30-50% dei pazienti sottoposti a resezione chirurgica. Metastasi linfonodali sono presenti nel 16% delle neoplasie in stadio T1, nel 28% delle T2, nel 40% delle T3 e nel 60% delle T4, secondo le casistiche riportate in letteratura.

Nei pazienti N0 la sopravvivenza a 5 anni riportata in letteratura è del 45%, mentre nei pazienti N1 è solo del 15%<sup>64-68</sup>.

#### 4. Metastasi a distanza (categoria M)

I siti più comuni di metastasi sono: il fegato, il peritoneo, il polmone e l'osso. La sopravvivenza media dei pazienti con metastasi non supera gli 11 mesi.

Le metastasi a distanza sono diagnosticate nel 30% dei pazienti durante le valutazioni preoperatorie o all'esplorazione laparotomica<sup>69,70</sup>.

#### 5. Pattern biologico macro- e microscopico

I fattori microscopici principali, che modificano la prognosi del PCC, sono: la differenziazione cellulare, l'infiltrazione perineurale, linfatica e microvascolare.

La differenziazione cellulare è un importante fattore prognostico, con una sopravvivenza di 35-40 mesi nelle neoplasie di grado G1 e G2, mentre è di 15-20 mesi per il grado G3<sup>71,72</sup>.

Secondo alcuni studi, l'infiltrazione perineurale è presente nel 60% dei casi; la sopravvivenza a 5 anni nei pazienti con infiltrazione perineurale è significativamente più bassa rispetto ai pazienti senza (30% vs. 68%)<sup>64</sup>.

L'invasione linfatica è presente in più del 70% delle neoplasie; in questi pazienti la sopravvivenza a 5 anni è del 30%, mentre è del 48% nei pazienti senza coinvolgimento linfatico<sup>64</sup>.

L'invasione microvascolare è importante nel determinare la sopravvivenza a lungo termine nei pazienti con PCC; la sopravvivenza a 5 anni in assenza e in presenza di invasione microvascolare è rispettivamente del 40% vs. 15%<sup>73</sup>.

Per il PCC non sono stati ancora analizzati in studi prospettici altri fattori prognostici biologici e molecolari, come le mutazioni di k-ras, p27, TGF $\beta$ . Invece, le alterazioni di p53 si presentano con frequenze tra il 38% e il 66% dei casi in letteratura e correlano con ridotta differenziazione, stadio avanzato di malattia e presenza di N<sup>+</sup><sup>74</sup>.



## **TRATTAMENTO CHIRURGICO**

Per una corretta valutazione preoperatoria dell'operabilità, devono essere presi in considerazione: lo stato fisico del paziente e la funzione epatica, il volume del fegato residuo (Future Liver Remnant, FLR), l'estensione biliare della neoplasia, il coinvolgimento vascolare, la presenza di atrofia del lobo, il coinvolgimento linfonodale, la presenza di metastasi a distanza<sup>110</sup>.

I due fattori clinici che possono maggiormente condizionare il risultato della chirurgia sono l'ittero preoperatorio e il volume di fegato residuo del paziente.

### **Colangiocarcinoma intraepatico**

I pazienti con colangiocarcinoma intraepatico presentano un'operabilità tra il 20% e il 70% nelle casistiche in letteratura<sup>75-76</sup>, per la presenza di metastasi intraepatiche o a distanza, invasione vascolare ilare o carcinosi peritoneale.

La resezione chirurgica radicale (R0) è il trattamento di scelta e l'unico che permetta di ottenere un'adeguata sopravvivenza a lungo termine.

Per ottenere la radicalità chirurgica possono essere necessarie epatectomie maggiori; inoltre, può essere necessaria la resezione della via biliare extraepatica, delle strutture vascolari ilari, della vena cava e del diaframma<sup>75,77-82</sup>.

Normalmente l'ICC si sviluppa su fegato non cirrotico, pertanto possono essere eseguite resezioni maggiori con bassa morbilità e mortalità. Il tasso di complicanze è legato al tipo d'intervento e varia tra il 35% nelle

epatectomie minori e il 55% nelle resezioni epatiche maggiori o associate a resezione vascolare o diaframmatica<sup>75,83</sup>. Nella maggior parte degli studi è riportata una mortalità inferiore al 5%, spesso legata a resezioni epatiche maggiori o associata a resezioni vascolari e biliari<sup>84</sup>.

In letteratura, la sopravvivenza a 5 anni varia dal 14% al 36% e non supera mai il 40%, anche nelle analisi più recenti. La resezione chirurgica radicale (R0) è l'unico fattore che può permettere sopravvivenze a lungo termine soddisfacenti, riportate fino all'80%<sup>75,79,85-89</sup>. La resezione non radicale (R1), invece, permette una sopravvivenza a 5 anni compresa tra lo 0% e il 25%.

### **Colangiocarcinoma peri-ilare**

I pazienti con colangiocarcinoma peri-ilare presentano un'operabilità tra il 20% e il 60%. Tra il 25% e 46% dei pazienti la non resecabilità è confermata solo dopo laparotomia<sup>75,90</sup>.

La resezione chirurgica radicale (R0) è il trattamento di scelta e l'unico che permetta di ottenere un'adeguata sopravvivenza a lungo termine. Per ottenere resezioni R0 si utilizzano: la resezione della via biliare principale e anastomosi bilio-digestiva; la resezione epatica; la resezione del lobo caudato (S1); la resezione vascolare (portale e/o dell'arteria epatica); la resezione della testa pancreatica e del duodeno (HPD).

I criteri di resecabilità sono molto variabili nelle esperienze riportate in letteratura; seguendo la classificazione del MSKCC vengono esclusi dal trattamento chirurgico i pazienti: con coinvolgimento della via biliare al di

sopra dei rami di 2° ordine bilateralmente, con atrofia di un lobo epatico controlaterale, con infiltrazione controlaterale dei rami biliari di 2° ordine o del ramo portale, con infiltrazione del tronco comune della porta o dell'arteria epatica prossimalmente alla biforcazione, con coinvolgimento dei linfonodi non regionali (para-aortici, celiaci, retropancreatici)<sup>33</sup>.

La resezione isolata della via biliare extraepatica è indicata solamente per il trattamento di neoplasie di tipo I e II secondo la classificazione di Bismuth-Corlette<sup>33,91</sup>. Tuttavia, numerose critiche sono state rivolte nei confronti di questa indicazione e questa procedura deve essere considerata inefficace, per quanto riguarda i risultati a lungo termine. Nelle casistiche riportate dal MSKCC non si rilevavano sopravvivenze a 5 anni nei pazienti che erano stati sottoposti alla resezione biliare isolata<sup>69</sup>. Risultati analoghi sono stati riportati da Miyazaki e Nimura: in un suo studio su 100 pazienti che erano stati sottoposti a questo intervento, il decesso si verificava per tutti entro 65 mesi. Inoltre questo tipo di intervento ha un tasso di recidiva alto, ovvero superiore al 76%. L'associazione della resezione epatica alla resezione della via biliare principale permette migliori sopravvivenze<sup>33,92,93,94</sup>.

La resezione del lobo caudato (S1) è sempre indicata in associazione con l'epatectomia per l'alta frequenza di infiltrazione dei rami biliari (tra il 48% e il 96%)<sup>93,95-99</sup>. La necessità della resezione del lobo caudato è stata descritta per la prima volta da Nimura nel 1990<sup>98</sup> e ora è largamente condivisa. Successivamente Sugiura ha dimostrato una sopravvivenza a 5 anni del 46% per i pazienti sottoposti a resezione epatica associata a resezione del lobo caudato, rispetto al 12% per quelli senza resezione del lobo caudato<sup>100</sup>.

La resezione isolata del lobo caudato associata con la resezione della via biliare extraepatica trova scarse indicazioni cliniche; essa è limitata ai casi di neoplasie che crescono alla biforcazione biliare e che sono confinate tra i dotti epatici destro e sinistro, con il solo coinvolgimento dei rami biliari destinati al lobo caudato stesso. I risultati di questo approccio appaiono peggiori di quelli ottenuti con resezioni epatiche più estese.

La morbilità dopo la resezione chirurgica del colangiocarcinoma peri-ilare è ancora gravata da un'elevata incidenza di complicanze gravi in circa il 50% dei pazienti e di mortalità peri-operatoria tra 5% e il 18% dei casi<sup>101-102</sup>.

Diversi fattori sono correlati con la morbilità post operatoria: l'ittero, la malnutrizione, l'entità della resezione epatica e la complessità dell'intervento chirurgico<sup>103</sup>.

L'insufficienza epatica postoperatoria è correlata con il volume del fegato residuo: il tasso di insufficienza d'organo è del 16% in pazienti con resezione epatica inferiore al 50% del volume totale, ma aumenta fino al 38% nei pazienti con resezione oltre il 50%<sup>104</sup>.

Altre complicanze postoperatorie frequenti sono: deiscenza dell'epaticodigiuno-anastomosi, dovuta a complicanze infettive e sanguinamenti intra-addominali. L'incidenza in letteratura varia tra l'1% e il 22% dei casi<sup>105</sup>.

La mortalità riportata in letteratura varia tra il 2% e il 10%<sup>103,104,105</sup>, e scende fino allo 0% in alcune recenti esperienze<sup>72,101</sup>.

L'invasione della vena porta è generalmente associata con atrofia lobare omolaterale, ma non è una controindicazione alla resezione chirurgica<sup>106</sup>.

Tuttavia, esistono delle controindicazioni alla resezione a seconda dell'estensione del coinvolgimento portale: nei casi di occlusione o di incarceramento del tronco portale principale prossimalmente alla sua biforcazione; nei casi di incarceramento portale bilaterale<sup>106</sup>.

La resezione portale è un fattore prognostico negativo; tuttavia questo intervento incrementa la sopravvivenza nei pazienti con coinvolgimento portale. Nei pazienti con resezione epatica combinata alla resezione portale le sopravvivenze a 3 e a 5 anni erano rispettivamente del 26 e del 10%; erano del 54 e del 37% rispettivamente nei pazienti che erano stati sottoposti alla sola resezione epatica.

Nelle recenti esperienze in letteratura, la resezione portale non incrementa le complicanze e il tasso di mortalità peri-operatoria<sup>106</sup>.

I dati sulla resezione e ricostruzione dell'arteria epatica sono ancora scarsi. Infatti la ricostruzione dell'arteria epatica è attuata meno frequentemente rispetto a quella della vena porta. Questo è dovuto al fatto che, spesso, questa condizione si associa con un stadio di malattia molto avanzato. Secondo alcuni autori<sup>69</sup>, il coinvolgimento dell'arteria epatica propria o dell'arteria del fegato residuo è una controindicazione alla resezione chirurgica. Anche se recenti studi sull'epatectomia maggiore associata con la ricostruzione dell'arteria epatica mostrano una bassa mortalità (0-8%) e anche se questa procedura può essere attuata con sicurezza, questo intervento è gravato da maggiori tassi di mortalità e morbilità rispetto all'epatectomia senza ricostruzione vascolare. Questi valori sono ancora elevati. Miyazaki ha osservato un tasso di mortalità del 78% nel gruppo di pazienti sottoposti a ricostruzione dell'arteria epatica rispetto al 38% in pazienti con resezione della vena porta e al 36% nei

pazienti senza resezione vascolare<sup>107</sup>. Per questa ragione, attualmente la ricostruzione dell'arteria epatica associata con l'epatectomia maggiore è da prendere in considerazione solo se si tratta di un tumore avanzato che può essere resecato radicalmente<sup>106</sup>.

Lo studio dell'Università di Nagoya ha messo in luce che l'unica controindicazione assoluta alla resezione-ricostruzione arteriosa è l'incarceramento bilaterale dell'arteria epatica da parte del tumore<sup>95</sup>.

In alcuni casi con l'infiltrazione neoplastica del tratto distale della via biliare, per poter ottenere la radicalità chirurgica, è necessario associare alla resezione epatica la resezione duodenale e della testa del pancreas (HPD)<sup>84,108</sup>.L'associazione di resezione epatica con pancreaticoduodenectomia (PD) aumenta il tasso di complicanze chirurgiche; Sano ha osservato complicanze postoperatorie in più dell'85% dei pazienti con PD combinata<sup>101</sup>.Nagino ha riportato un'incidenza di insufficienza epatica del 50% nei pazienti con PD combinata rispetto al 25% nei pazienti senza PD<sup>109</sup>.

La sopravvivenza dopo resezione è migliorata negli ultimi decenni con un tasso di sopravvivenza a 5 anni che varia dal 12% al 40%. Neuhaus ha riferito la sopravvivenza a 5 anni nelle resezioni R0 del 39% rispetto al 9%, e 0% per le resezioni R1 e R2<sup>94</sup>.

### **Markers e colangiocarcinoma**

Da un punto di vista laboratoristico, i markers tumorali CA-125 e CEA possono essere elevati; tuttavia, essi sono totalmente aspecifici potendo essere elevati in molte altre patologie neoplastiche gastro-intestinali e ginecologiche e nel caso di patologie infiammatorie delle vie biliari. Il CA

19-9 è il marcatore più comunemente utilizzato come marker per il colangiocarcinoma.

### **CA 19-9 e colangiocarcinoma**

Il CA 19-9 è una glicoproteina ad alto peso molecolare che in condizioni fisiologiche è sintetizzata dalle cellule epiteliali dei dotti pancreatici e biliari, dello stomaco, del colon e dell'endometrio <sup>111</sup> ed è inoltre rilevabile nel muco salivare e nel meconio <sup>112</sup>.

Il CA 19-9 è espresso da numerose neoplasie epiteliali, sia di origine gastro-intestinale, come ad esempio il cancro del pancreas, delle vie biliari, dello stomaco, del colon, che di origine non gastro-intestinali (carcinoma del polmone, della mammella e dell'ovaio) <sup>113</sup>. E' rivelabile in dosaggi elevati anche in condizioni patologiche non neoplastiche sia di origine epato-bilio-pancreatica (ittero ostruttivo, colestasi, pancreatite, calcolosi intraepatica, epatite cronica, cirrosi e colangite), così come in condizioni respiratorie (bronchiectasie, bronchioliti, enfisema e fibrosi interstiziale) <sup>114</sup>, renali e reumatologiche <sup>112</sup>.

L'interpretazione dell'innalzamento del valore di questo marcatore in soggetti asintomatici risulta essere difficile, poiché si è visto che l'incidenza di patologia neoplastica tra questi soggetti è soltanto del 2.8% e le cause possibili dell'aumento del marcatore, neoplastiche e non neoplastiche, sono molto numerose <sup>113</sup>.

Attualmente il CA 19-9 è il marker tumorale di principale utilizzo nella diagnosi e nella gestione del colangiocarcinoma. In uno studio condotto da Morris-Stiff nel 2009, la sensibilità è risultata dell'84.9% e la specificità del 69.7%, con un valore cut-off del CA 19-9 di 37 U/ml<sup>115</sup>, mentre in uno

studio condotto da Jhon e Haghghi nel 2006, sono risultate rispettivamente del 77.9% e del 76.3%, utilizzando un valore cut-off di riferimento pari a 35 U/ml<sup>116</sup>.

L'utilizzo di questo marcatore nella diagnosi del colangiocarcinoma diviene ancora più complessa in presenza di alcune condizioni patologiche comuni alle patologie neoplastiche e infiammatorie:

Nei pazienti itterici, affetti da colangiocarcinoma, l'utilizzo del CA 19-9 per la ricerca del colangiocarcinoma risulta gravata da numerosi falsi positivi. Per un cut-off del CA 19-9 pari a 90 U/ml la specificità è del 61%<sup>112</sup>, mentre per un valore di 300 U/ml essa aumenta al 80% ma a scapito della sensibilità che diviene pari soltanto al 53%<sup>114</sup>. Nei pazienti con ittero ostruttivo questo marcatore non consente di discriminare tra patologie benigne e maligne con sufficiente accuratezza<sup>112</sup>.

L'utilizzo di questo marcatore nel processo diagnostico differenziale acquista maggiore attendibilità alla risoluzione dell'ittero: i pazienti affetti da ostruzioni benigne hanno mostrato nella maggioranza dei casi un sensibile calo del valore del CA 19-9, a differenza dei pazienti affetti da un colangiocarcinoma, nei quali il valore del marker si mantiene elevato.

E' stato definito come fortemente indicativo di patologia ostruttiva maligna un valore del CA 19-9 superiore a 90 U/ml dopo drenaggio (sensibilità 95% e specificità 61%)<sup>112</sup>.

Nei pazienti affetti da colangite acuta si assiste costantemente ad un aumento del CA 19-9, che può raggiungere anche valori pari a 60.000 U/ml. Normalmente, in caso di patologia benigna il valore del CA 19-9 sierico ritorna a livelli fisiologici entro 2 mesi dopo la risoluzione della patologia infiammatoria.



Al contrario nei pazienti affetti da colangite sclerosante il CA 19.9 è un marcatore molto utile e affidabile nella diagnosi di colangiocarcinoma con una sensibilità e specificità del 89% e 86% rispettivamente per un valore di cut-off di 100 U/ml<sup>24</sup>.

## **MUCINE**

Le mucine sono delle glicoproteine di grandi dimensioni che rappresentano i principali componenti strutturali del muco e sono dotate di molteplici funzioni tra le quali quella di conferire protezione e lubrificazione alla superficie del tessuto epiteliale che riveste i dotti e il lume di visceri cavi. Sono coinvolte in processi biologici complessi, come il rinnovamento, la differenziazione e l'adesione cellulare.

Recenti studi hanno evidenziato anche il loro ruolo nella patogenesi neoplastica.

In condizioni fisiologiche, la produzione delle mucine è regolata da fattori che assicurano un preciso pattern tissutale di espressione ed una distribuzione specifica in relazione al tempo e allo stadio differenziativo delle cellule epiteliali. Tuttavia, l'omeostasi delle mucine può essere alterata dall'azione di fattori ambientali e/o intrinseci, che colpiscono l'integrità cellulare. Molte neoplasie e patologie infiammatorie risultano, infatti, spesso associati ad una deregolazione nella produzione delle mucine.

### **Struttura e classificazione**

La struttura di base delle mucine è rappresentata da uno "scheletro" proteico definito "apomucina", connesso a gruppi oligosaccaridici. Si conosce l'esistenza di circa 20 mucine che in base alla loro struttura sono state suddivise in due classi principali: le mucine secretorie (gel-forming e

non gel-forming) e le mucine legate alla membrana. La differenza principale tra i membri di queste due classi è rappresentata dalla presenza, in quest'ultime, di un dominio trans-membrana che ancora le mucine alla membrana plasmatica <sup>117</sup> (Fig.2).

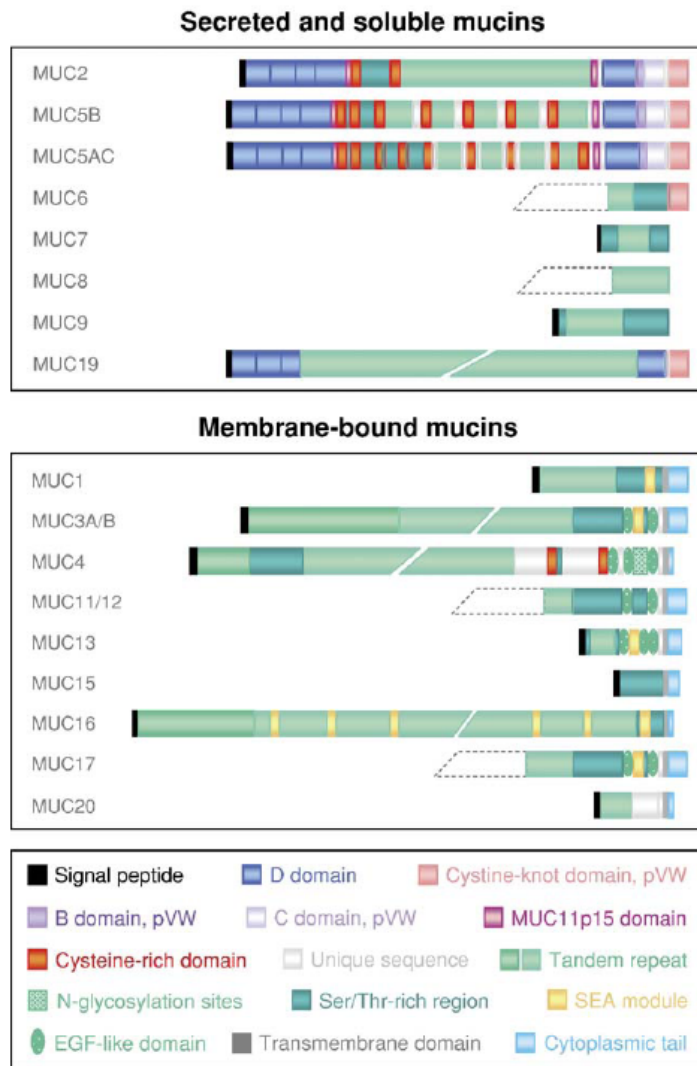


Fig.2 Struttura delle mucine secretorie e delle mucine trans-membrana.

### Mucine secretorie “gel-forming”: MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6

Il gene che codifica per queste mucine è localizzato sul cromosoma 11p15

Esse sono prodotte da strutture specializzate generalmente costituite da goblet cells della superficie dell'epitelio e dalle cellule produttrici muco delle ghiandole sub-mucosali. Dal punto di vista strutturale, la parte della glicoproteina costituita dall'apomucina è tipicamente caratterizzata dalla presenza di una regione ricca in cisteina chiamata "CK" (Cysteine Knot) con azione di trasporto attraverso il reticolo endoplasmatico rugoso, dei siti per la dimerizzazione della mucina e da domini "D" che hanno caratteristiche simili alle regioni corrispondenti del pro-fattore di vonWillenrand ( vWF ), con azione favorente l'oligomerizzazione delle mucine.

Queste mucine sono responsabili delle proprietà viscoso-elastiche del gel mucoso localizzato sulle superfici epiteliali del corpo.

#### **Mucine secretorie "non gel-forming": MUC7, MUC8, MUC9**

I geni che codificano per queste mucine sono localizzati, rispettivamente, sui cromosomi 4, 12 e 1 <sup>117</sup>.

#### **Mucine legate alla membrana: MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20.**

Queste mucine possiedono un dominio idrofobico transmembrana, con un dominio N-terminale extra-cellulare ed un dominio C-terminale citoplasmatico, che possiede un ruolo nella trasduzione del segnale <sup>118</sup>.

#### **Profili di espressione della mucina 5AC**

Le mucine sono prodotte da una varietà di cellule epiteliali situate, generalmente ma non solo, nell'interfaccia tra il tessuto epiteliale che

riveste i dotti ed il lume. Le mucine secretorie sono i maggiori componenti del gel mucoso di rivestimento.

I vari organi mostrano un differente profilo di espressione delle mucine, tuttavia alcune vengono espresse in organi diversi e le loro caratteristiche biochimiche (es. il pattern di glicosilazione) sono legate al tipo di organo, allo stadio di sviluppo o alla condizione fisiologica delle cellule (es.: normale vs patologica). Gli organi produttori di mucina principali sono l'apparato respiratorio, il tratto digerente e l'apparato riproduttivo. Altri organi sono rappresentati dalla ghiandola mammaria, dall'apparato uditivo, oculare e urinario (Fig. 3).

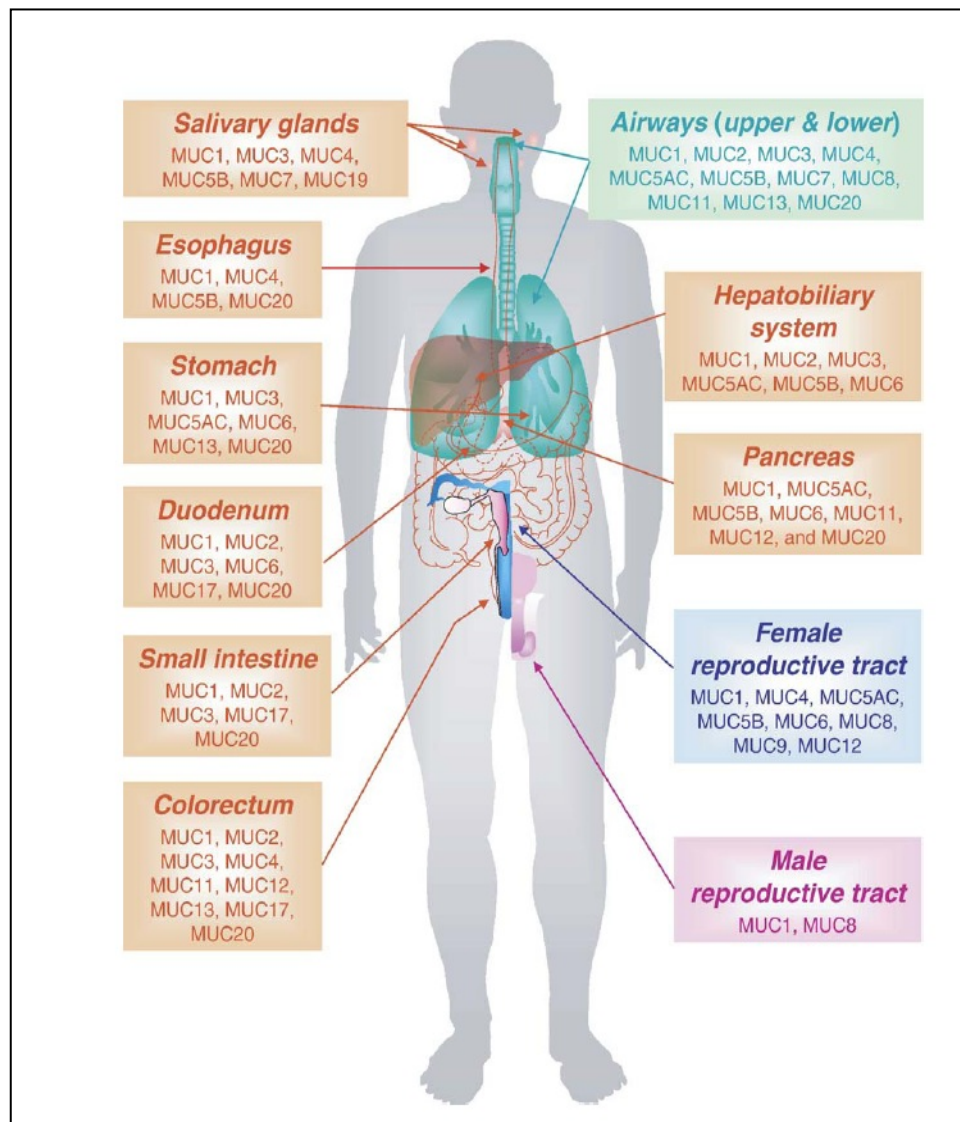


Fig. 3 Distribuzione dell'espressione delle mucine nel corpo umano in condizioni fisiologiche; esse sono prodotte da una grande quantità di tessuti epiteliali.

### **Tratto respiratorio e vie aeree**

In condizioni fisiologiche sono espresse numerose mucine, MUC5AC e MUC5B come mucine predominanti. MUC5AC è la principale mucina a livello tracheo-bronchiale<sup>118</sup> ed è prodotta esclusivamente dalle goblet cells muco-secretorie epiteliali, mentre MUC5B è più spesso trovata a livello delle cellule muco-secretorie delle ghiandole sub-mucosali.

Un cambiamento nel livello di espressione o nel profilo di distribuzione delle mucine avviene nelle neoplasie del polmone e in varie malattie infiammatorie delle vie aeree come la malattia polmonare ostruttiva cronica, la bronchite cronica, l'asma e la fibrosi cistica. In queste due ultime condizioni patologiche si assiste ad un aumento nell'espressione di MUC5AC e questo può far pensare ad un suo ruolo nella patogenesi di queste malattie<sup>119</sup>. Tipicamente nell'adenocarcinoma del polmone, soprattutto se ben differenziato, si nota un aumentato livello di trascrizione delle MUC1, MUC3 e MUC4. La maggioranza dei tumori non a piccole cellule del polmone è caratterizzata da una sovra-regolazione di MUC4, suggerendo un ruolo di questa mucina nella patogenesi neoplastica. Il carcinoma bronchio-alveolare mostra invece, tipicamente, una sovra-espressione di MUC2, MUC5AC, MUC5B e MUC6; il carcinoma epidermoide, al contrario, è caratterizzato dalla perdita di espressione di MUC5AC e MUC5B<sup>117</sup>.

### **Apparato riproduttivo**

Il tratto riproduttivo femminile, fisiologicamente, esprime varie mucine, sia secretorie che legate alla membrana: a livello dell'endocervice MUC5AC è espressa in grande quantità <sup>117</sup>.

### **Apparato digerente**

#### ESOFAGO E STOMACO

Fisiologicamente MUC5AC è la principale mucina espressa a livello della superficie epiteliale gastrica, insieme a MUC6, espressa invece a livello delle cellule ghiandolari dello stomaco. Un aumento patologico dei livelli di espressione di MUC5AC si nota nella metaplasia gastrica; nella displasia ad alto grado e nell'adenocarcinoma dell'esofago si assiste invece ad una sotto-espressione di questa mucina. Il carcinoma gastrico è caratterizzato dalla perdita di espressione di MUC5AC e MUC6.

#### PICCOLO E GROSSO INTESTINO

In condizioni fisiologiche non è presente espressione di MUC5AC. Il pattern di espressione delle mucine risulta alterato nelle malattie infiammatorie croniche e nelle malattie neoplastiche. Nel morbo di Crohn, ad esempio, la mucosa ileale mostra un'espressione ectopica di MUC5AC, facendo pensare ad un ruolo della mucina nella patogenesi di questa malattia; nel cancro del colon-retto, la progressione adenoma-carcinoma è caratterizzata dalla neosintesi di MUC5AC.

PANCREAS: Numerose mucine sono espresse, in condizioni fisiologiche, dal pancreas, come ad esempio la MUC5AC; la pancreatite cronica, condizioni infiammatorie, paraneoplastiche e neoplasie del pancreas sono caratterizzate da una sotto-regolazione della MUC5AC e questa mucina risulta espressa a livelli variabili, nelle linee cellulari <sup>118,120</sup>; tuttavia, un'alta percentuale dei tumori papillari mucinosi intra-duttali e pochi casi, invece,

tra i carcinomi duttali invasivi, mostrano un'espressione di MUC5AC. Un'espressione significativa di questa mucina nei pazienti con cancro del pancreas correla con una migliore prognosi <sup>117</sup>.

**SISTEMA EPATO-BILIARE:** Fisiologicamente a livello delle cellule epiteliali biliari le mucine espresse sono MUC3, MUC5B e MUC6, mentre MUC5AC è assente o espressa a livelli molto bassi <sup>121</sup>.

La trasformazione neoplastica delle cellule epiteliali si associa ad alterazioni nella sintesi delle mucine; gli epitopi proteici delle mucine e i livelli di mRNA sono spesso alterati nell'adenocarcinoma rispetto al tessuto normale. Anche in condizioni non neoplastiche, come ad esempio nell'epatolitiassi, si notano alterazioni nei profili di espressione delle mucine. Attraverso studi condotti su sezioni tissutali si è potuto dimostrare che, in quest'ultima condizione patologica, si ha la predominante espressione di MUC3 e MUC5B; la presenza di elevati livelli di espressione di MUC5AC si ha invece soltanto nelle cellule epiteliali, soprattutto se displastiche, dei grossi dotti biliari intra-epatici, contenenti calcoli. Per quest'ultima mucina è stato ipotizzato un ruolo nell'iniziazione dell'epatolitiassi e nella sua progressione in colangiocarcinoma <sup>118</sup>.

Nel colangiocarcinoma è stata dimostrata un'espressione minore o assente di MUC2, MUC3 e MUC5B, rispetto al tessuto non neoplastico, ed un forte aumento nell'espressione di MUC5AC <sup>122</sup>.

Nel colangiocarcinoma perillare che origina nei grossi dotti biliari, ed anche nel colangiocarcinoma intraepatico (ICC) associato ad epatolitiassi, si ha una frequente iper-espressione di MUC5AC <sup>118,122,123,124</sup>. MUC5AC è frequentemente espressa nella displasia dell'epitelio biliare e la "metaplasia gastrica" rappresenta un evento precoce nel processo di

carcinogenesi dell'ICC, soprattutto quando associato ad epatoliti. Al contrario, invece, l'espressione di MUC5AC risulta fortemente diminuita o assente, nel colangiocarcinoma intraepatico periferico<sup>124</sup>. L'espressione di MUC5AC nell'ICC è associata ad una maggiore incidenza di metastasi linfonodali e rappresenta, inoltre, un fattore prognostico indipendente, dimostrato in vari studi sull'analisi di sopravvivenza<sup>124</sup>.

I pochi studi condotti fino ad oggi sul rapporto tra MUC5AC ed il colangiocarcinoma si sono basati sul dosaggio di questa mucina nel siero e sulla sua espressione nel tessuto neoplastico dei pazienti<sup>125,126,127</sup>.

La MUC5AC, pressoché assente nelle cellule biliari normali, mostra invece un'espressione aberrante nel tessuto coinvolto da questa neoplasia nel 66.7% dei pazienti, suggerendo anche la possibilità che le cellule epiteliali biliari assumano un fenotipo gastrico durante la carcinogenesi<sup>125</sup>.

La presenza di espressione a livello tissutale è associata alla presenza della MUC5AC nel siero; la secrezione ad opera delle cellule del colangiocarcinoma aumentano i livelli sierici per l'occlusione meccanica dei dotti biliari, la perdita di polarità delle cellule biliari e/o l'invasione precoce dei vasi sanguigni.

Il dosaggio sierico di MUC5AC è effettuato mediante test con specificità del 96.9%, sensibilità del 62.6%, valore predittivo positivo pari al 93.3% e valore predittivo negativo del 78.8%, per la diagnosi di colangiocarcinoma.

MUC5AC può avere anche un importante ruolo nella diagnosi differenziale tra il colangiocarcinoma e altre malattie infiammatorie croniche o benigne dei dotti biliari (ad esempio, colelitiasi e opistorchiasi), a differenza del CA19-9 che invece mostra un innalzamento significativo anche in queste



condizioni patologiche non neoplastiche, nonché in presenza di ittero, colangite acuta e cirrosi.

La MUC5AC sierica può quindi rappresentare un marker per il colangiocarcinoma e potrebbe essere utile per il follow-up dei pazienti dopo resezione chirurgica o chemioterapia <sup>126,127</sup>.

MUC5AC ha inoltre valore predittivo di un outcome sfavorevole per i pazienti, il livello sierico di MUC5AC è correlato ad uno stadio TNM avanzato ( $p < 0.016$ ) e si correlano con una prognosi peggiore <sup>125</sup>.

Infine, mediante misurazioni seriate e distribuite nel tempo di MUC5AC nel siero di questi pazienti, dopo trattamento chirurgico ad esempio, potrebbe essere possibile diagnosticare precocemente la presenza di recidiva di malattia e stabilire l'efficacia della terapia neo-adiuvante ed adiuvante, quando effettuate <sup>125</sup>.

**OBIETTIVO DELLA TESI**

L'obiettivo di questa tesi è di valutare il livello sierico di MUC 5AC in un gruppo di pazienti affetti da colangiocarcinoma intraepatico o periiliare, in pazienti con colelitiasi, in pazienti con stenosi biliari infiammatorie e in un gruppo di pazienti senza patologie epatobiliari.

I livelli sierici di MUC 5AC sono stati correlati inoltre con la prognosi dei pazienti sottoposti a resezione ad intento radicale per colangiocarcinoma intraepatico e peri-iliare.

## **MATERIALI E METODI**

Nel periodo tra Gennaio 2007 e Giugno 2011, presso la Chirurgia Generale "A", diretta dal Prof. Alfredo Guglielmi sono stati selezionati 69 pazienti, affetti da calcolosi della colecisti, epatoliti con stenosi benigne della via biliare colangiocarcinoma peri-ilare e periferico e un gruppo di pazienti senza patologie epato-biliari.

I pazienti appartenenti ai tre gruppi sono stati sottoposti ad un prelievo di siero prima dell'intervento previo consenso informato.

Nei campioni di siero dei pazienti appartenenti a tutti e 3 i gruppi è stato eseguito il dosaggio della MUC 5 AC (mucina 5AC) e del CA 19.9 (Carbohydrate Antigen) e del CEA.

### **Analisi immunoenzimatica per la ricerca di MUC5AC nel siero**

Ciascun siero, ottenuto da ognuno dei pazienti, è stato centrifugato a 4000 rpm a 4°C ed in seguito suddiviso in 4 aliquote, ciascuna da 500 ul, che sono state immediatamente riposte in congelatore a -80°C.

Il dosaggio di MUC5AC sui campioni di siero, appartenenti ai pazienti sani, sono stati eseguiti sull'intero, mentre gli esami sui sieri provenienti dai pazienti patologici sono stati eseguiti previa diluizione 1:2 dei sieri stessi, per evitare il fenomeno di Hook, ossia una sottostima dei risultati a causa della presenza in eccesso di antigene.

Per l'analisi immunoenzimatica è stato utilizzato un Kit ELISA USCNK, con impiego di una mucina umana.

I campioni di siero, con opportune diluizioni, sono stati erogati in una piastra con micro-pozzetti precedentemente coattati con un anticorpo monoclonale di cattura (45 M1) specifico per la MUC 5AC; dopo

opportuna incubazione a 37°C è stato aggiunto un anticorpo policlonale di rilevamento, coniugato con biotina. Quindi, il tutto è stato posto ulteriormente in incubazione. In seguito, dopo ripetuti lavaggi effettuati con lo scopo di allontanare il “non-legato”, è stata aggiunta avidina coniugata con perossidasi di rafano (HRP). A questo punto, soltanto i pozzetti contenenti MUC 5AC, anticorpo biotina-coniugato ed avidina enzima-coniugata, hanno mostrato una variazione nel colore.

La reazione enzima-substrato è stata terminata dall’aggiunta di soluzione di acido solforico e la variazione di colore viene misurata spettrofotometricamente alla lunghezza d’onda di 450nm +/- 2 nm, ed è direttamente proporzionale alla quantità di complessi antigene-anticorpo presenti. La concentrazione di MUC 5AC nei campioni è stata quindi determinata mediante comparazione della densità ottica (O.D) dei campioni, sulla curva standard.

### **CALCOLO DEI RISULTATI**

Le reazioni sono state interpretate e valutate sulla base delle densità ottiche rilevate. Si deve ottenere una curva standard, ponendo i dati ottenuti in un sistema di assi cartesiani

Per la prima volta, all’interno del nostro studio, sono stati assegnati dei valori quantitativi, espressi in ng/ml, alle diverse densità ottiche rilevate, non limitandoci quindi ad effettuare soltanto un confronto qualitativo tra le diverse densità ottiche ottenute.

## **ANALISI STATISTICA**

I dati sono stati raccolti prospettivamente ed elaborati utilizzando il software di elaborazione statistica SPSS versione 20.0 (SPSS Inc. – Chicago, IL, USA).

Il confronto tra medie su variabili indipendenti è stato realizzato mediante test t-student. Il confronto fra variabili categoriali è stato eseguito con tavole di contingenza e test chi quadrato. La valutazione della sopravvivenza è stato eseguita con il metodo Kaplan Meier e la verifica della significatività per differenti fattori è stato eseguito con Log Rank Test. Valori significativi sono stati identificati con  $p < 0.05$ .

## RISULTATI

Un totale di 69 pazienti sono stati sottoposti alla valutazione del dosaggio sierico di MUC 5AC, CEA e CA 19.9.

In questo gruppo di pazienti 27 pazienti erano affetti da colangiocarcinoma intraepatico o peri-ilare, 21 da patologia biliare benigna (15 colelitiasi e 6 epatolitiasi e stenosi biliari infiammatorie), 5 da altre neoplasie primitive o secondarie epatiche (3 HCC e 2 metastasi da neoplasia del colo-retto) e 16 controlli (senza patologia neoplastica né patologia litiasica o infiammatoria della via biliare).

### *Valore diagnostico MUC 5AC*

La prima analisi effettuata è stata la valutazione del valore diagnostico del dosaggio sierico di MUC 5AC comparato con i valori sierici di CA 19.9 e CEA.

I pazienti affetti da colangiocarcinoma hanno dimostrato valori significativamente più elevati di MUC 5 AC nei confronti dei pazienti con patologia litiasica o infiammatoria della via biliare e nei confronti del gruppo di pazienti sani. I valori medi di mucina sierica nei pazienti con colangiocarcinoma è stata di  $21.38 \pm 10.76$  ng/ml, di  $6.20 \pm 5.60$  ng/ml nei pazienti con patologia litiasica, di  $6.08 \pm 8.47$  ng/ml nei pazienti con altre neoplasie e di  $2.74 \pm 1,35$  ng/ml nei controlli sani ( $p=0.01$ ). I pazienti con colangiocarcinoma hanno presentato valori più elevati in modo statisticamente significativo sia nei confronti dei 16 pazienti con patologia litiasica ( $P=0.001$ ), sia dei pazienti con epatolitiasi e stenosi infiammatorie ( $P=0.01$ ), sia nei confronti dei pazienti con altre neoplasie epatiche ( $p=0.005$ ) sia nei confronti dei controlli sani ( $P=0.001$ ). Nei pazienti affetti da patologia litiasica o con stenosi benigne hanno presentato valori

significativamente maggiori nei confronti dei controlli sani ( $p=0.01$ ). (Figura 4)

L'ulteriore analisi di sottogruppo tra pazienti con colangiocarcinoma e pazienti con epatolitiasi e stenosi infiammatorie delle vie biliari il valore di MUC 5AC si è dimostrato significativamente aumentato nelle neoplasie, con valori di  $21.38 \pm 10.76$  ng/ml e  $10.17 \pm 6.49$  ng/ml, rispettivamente ( $p=0.01$ ).

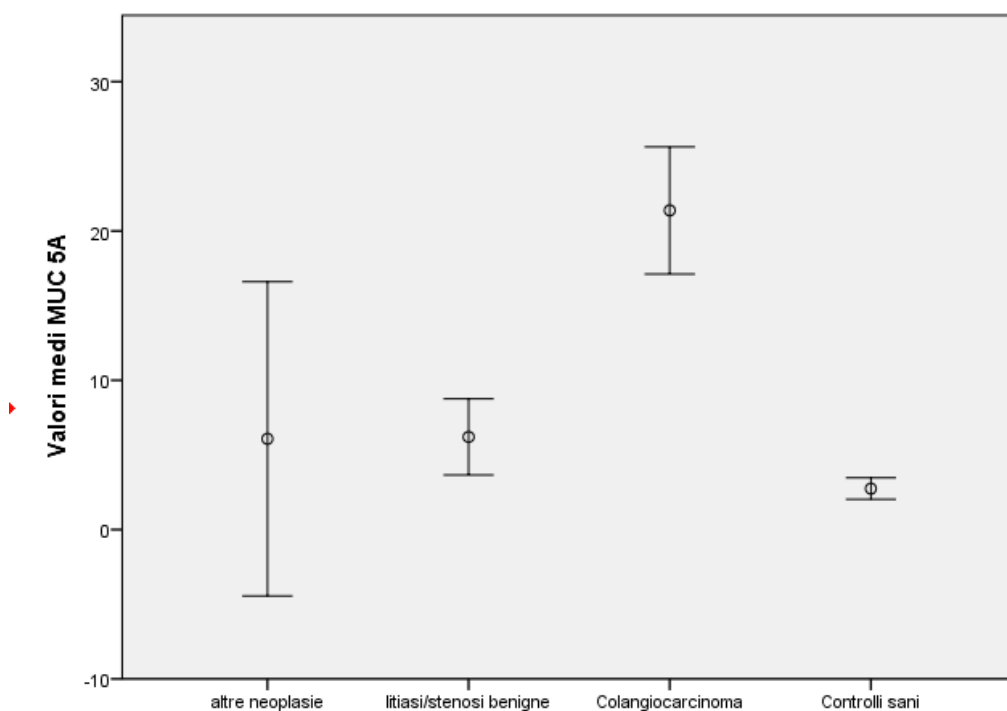


Figura 4: confronto valori medi della MUC 5 AC nelle differenti patologie

In una seconda fase i risultati ottenuti per MUC 5 AC sono stati comparati con i dati ottenuti dall'analisi di CEA e CA 19.9.

Nelle medesime categorie i valori medi di CEA sono stati di  $4.75 \pm 9.26$  ng/ml nei pazienti con colangiocarcinoma, di  $1.46 \pm 1.2$  ng/ml nei pazienti con patologia litiasica, di  $6.08 \pm 8.4$  ng/ml nei pazienti con altre neoplasie epatiche e di  $1.89 \pm 2.71$  ng/ml nei controlli sani, le differenze non è stata

statisticamente significativa ( $p=0.19$ ). In particolare i pazienti con colangiocarcinoma non hanno dimostrato valori significativamente più elevati nei confronti dei pazienti con patologia litiasica o stenosi infiammatorie ( $p=0.1$ ).

Nella successiva analisi per i valori di CA 19.9 i valori medi sono stati di  $501.85\pm 977.75$  U/ml nei pazienti con colangiocarcinoma, di  $29.58\pm 65.35$  U/ml nei pazienti con patologia litiasica, di  $161.5\pm 215.21$  U/ml nei pazienti con altre neoplasie epatiche e di  $13.69\pm 32.90$  U/ml nei controlli sani, la differenza è stata statisticamente significativa ( $p=0.03$ ). In particolare i pazienti con colangiocarcinoma hanno dimostrato valori significativamente più elevati nei confronti dei pazienti con patologia litiasica o stenosi infiammatorie ( $p=0.03$ ).

Il valore diagnostico della MUC 5 AC sierica è stato successivamente valutato con la metodica delle curve ROC per identificare capacità del test di predire la presenza di colangiocarcinoma comparando i dati ottenuti per MUC 5 AC con quelli per il CEA e CA 19.9. Le diverse ROC curve sono rappresentate in figura 5. L'area sottostante la curva (AUC) è stata significativamente maggiore in MUC 5AC nei confronti di CA 19.9 e CEA con valore di 0.94, 0.84 e 0.59, rispettivamente. La successiva analisi di sottogruppo limitata ai pazienti con colangiocarcinoma ed epatolitiasi e stenosi benigna della via biliare ha confermato la superiorità dei test con MUC 5AC nei confronti di CA 19.9 e CEA con valori sottostanti alla curva (AUC) rispettivamente di 0.83, 0.73 e 0.59.



Fi

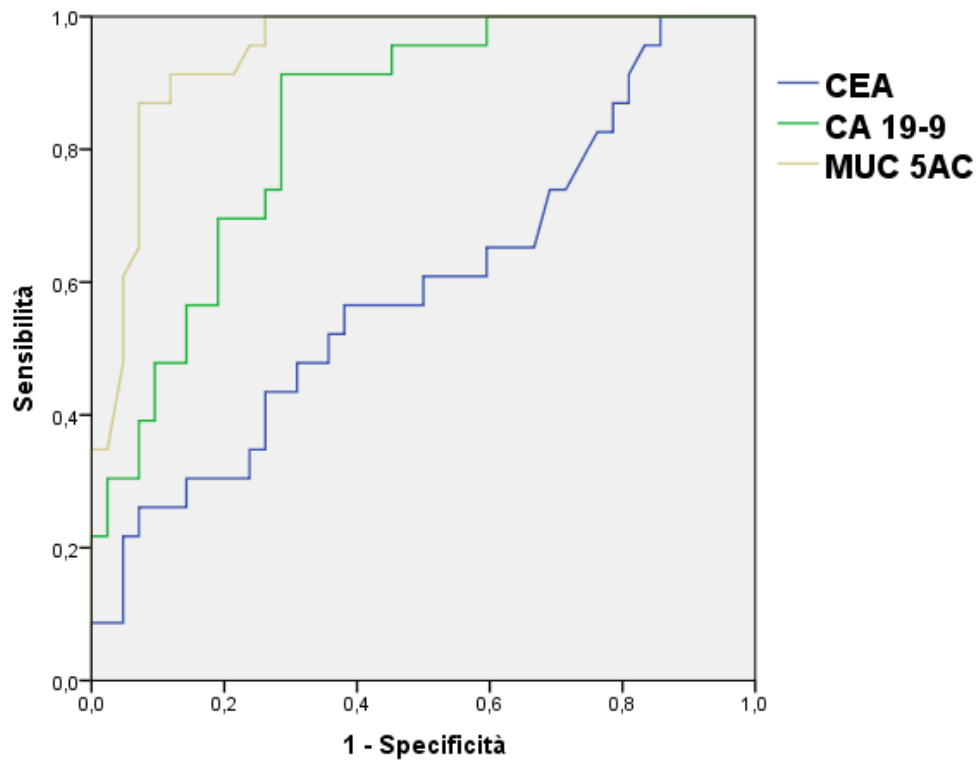


Figura 5: Curve ROC per la diagnosi di colangiocarcinoma, la curva di sensibilità e specificità del test è stata eseguita per MUC 5AC, CA 19.9 e CEA.

*MUC 5AC e prognosi chirurgia colangiocarcinoma*

In una seconda fase è stato analizzato il ruolo prognostico dei valori sierici di MUC 5AC nei pazienti affetti da colangiocarcinoma.

Le caratteristiche dei pazienti affetti da colangiocarcinoma sono riportati in tabella 1.

**Tabella 1:** Caratteristiche demografiche dei 27 pazienti con Colangiocarcinoma

Variabili	
Età (anni)	69 (45-83)
Sesso (M/F)	15/12
MUC 5AC (ng/mL)	21.38 (10.34-48.65)
CA 19.9 sierico (U/mL) <sup>a</sup>	522.8 (4-3885)
CEA sierico (ng/mL) <sup>a</sup>	3.1 (0.48-22.2)
Sede	
Periilare	21 (81%)
Intraepatico	6 (19%)
Morfologia	
Mass Forming	11 (38%)
Periilare	16 (62%)
Stadio	
I-III	13 (46%)
IVA-IVB	14 (54%)
Resezione epatica	
Si	18 (65%)
No	9 (35%)
Sopravvivenza (mesi) <sup>a</sup>	21 (2-65)

<sup>a</sup> =Valore medio

I valori medi del dosaggio sierico di MUC 5 AC, CA 19.9 e CEA sono stati confrontati in funzione delle differenti caratteristiche morfologiche, dello stadio e della presenza di localizzazioni a distanza.

Dall'analisi riportata abbiamo osservato che i valori medi di MUC 5 AC sono stati significativamente più elevati nei pazienti con malattia metastatica, mentre i valori medi di CA 19.9 e CEA non sono stati significativamente differenti.

Tabella 2: valori medi di MUC 5AC, CA 19.9 e CEA nei pazienti con colangiocarcinoma e la loro correlazione con le differenti caratteristiche del tumore

	MUC 5AC (ng/ml) Valore medio	p	CA 19.9 (U/ml) Valore medio	p	CEA (ng/ml) Valore medio	P
Tipo macroscopico		0.12		0.04		0.01
Infiltrativo	22±11		592±1051		2±2	
Formante Massa	15±6		75±48		11±14	
Inf. Perineurale		0.40		0.37		0.29
No	19±4		17±1		3±1	
Si	16±7		968±1390		1±0.8	
Resezione		0.87		0.51		0.65
No	21±12		702±1335		3±7	
Si	21±10		381±714		5±10	
M Linfonodali		0.21		0.91		0.69
N0	23±9		380±636		2±1	
N1	17±9		428±876		2±2	
Metastasi		0.01		0.21		0.78
M0	17±8		371±715		3.1±5.5	
M1	31±9		1005±1586		2.4±2.6	

La successiva analisi di sopravvivenza nei pazienti sottoposti a resezione con intento radicale ha evidenziato che i pazienti con valori sierici di MUC 5AC inferiori a 13 ng/ml avevano sopravvivenza maggiori nei confronti dei pazienti con valori maggiori, sopravvivenza a 3 anni del 60 % e 20 % rispettivamente (p=0.49).

## DISCUSSIONE

Il colangiocarcinoma, in ordine di frequenza, rappresenta la seconda neoplasia epatica primitiva maligna, rappresentando meno del 2% delle neoplasie totali e costituendo la causa del 10-20% dei decessi dovuti a neoplasie maligne epato-biliari ed il 13% dei 7,6 milioni/anno di decessi cancro-correlati nel mondo. Può svilupparsi in qualsiasi tratto dell'albero biliare, anche se nel 50-60% dei casi è localizzato a livello della biforcazione biliare <sup>128</sup>.

La chirurgia resettiva è la sola opzione terapeutica in grado di assicurare sopravvivenze a lungo termine accettabili, ma è riservata a solo il 20% dei pazienti <sup>95</sup>.

L'esordio clinico tardivo e con segni e sintomi aspecifici, simili a quelli di numerose altre patologie non neoplastiche del fegato e delle vie biliari, costituiscono alcuni tra gli elementi che concorrono a determinare la difficoltà nella diagnosi e nel riconoscimento precoce di questa neoplasia.

Al momento attuale non esistono markers tumorali specifici per il colangiocarcinoma. I markers sierici più utilizzati sono il CA 19.9, IL CEA. La sensibilità e la specificità di tali markers è bassa e non possono fornire una diagnosi certa di colangiocarcinoma, possono avere valori elevati anche per patologie benigne.

Il CA 19-9 è il marcatore più comunemente utilizzato come marker per il colangiocarcinoma <sup>129</sup>. Questo antigene cancro-associated risulta essere penalizzato in sensibilità e specificità, sia per quanto riguarda la diagnosi differenziale tra patologie bilio-pancreatiche benigne e maligne, sia nella diagnosi di questo specifico tumore. In uno studio condotto da Morris-Stiff <sup>115</sup> nel 2009, la sensibilità è risultata dell'84.9% e la specificità del 69.7%,

con un valore cut-off del CA 19-9 di 37 U/ml, mentre in uno studio condotto da Jhon e Haghghi <sup>116</sup> nel 2006, sono risultate rispettivamente del 77.9% e del 76.3%, utilizzando un valore cut-off di riferimento pari a 35 U/ml.

Un miglioramento in termini di specificità (82.1%) è ottenibile mediante l'innalzamento del valore cut-off posto per il CA 19-9 a 75 U/ml, pur restando il risultato non ancora soddisfacente.

L'utilizzo di questo marcatore nella diagnosi del colangiocarcinoma diviene ancora meno utile e meno sensibile in presenza di ittero e colangite <sup>24</sup>.

Il nostro studio ha l'obiettivo di dimostrare che i valori sierici di mucina 5AC possa divenire un nuovo marker sierico sensibile e specifico per il colangiocarcinoma.

La MUC 5AC viene fisiologicamente espressa soltanto dagli epitelii di alcuni organi e apparati, quali l'apparato respiratorio, la superficie epiteliale gastrica e l'apparato riproduttivo femminile, a livello dell'endocervice.

Per quanto riguarda le cellule epiteliali biliari, in condizioni fisiologiche, esprimono mucina 5AC solo nei dotti biliari di grandi dimensioni.

La MUC5AC mostra invece un'espressione aberrante nel tessuto coinvolto dalla neoplasia suggerendo che le cellule epiteliali biliari assumano un differente fenotipo durante la carcinogenesi.

La presenza di quest'aberrante espressione a livello tissutale si associa ad un incremento di MUC5AC nel siero; la secrezione da parte delle cellule neoplastiche è secondaria all'occlusione meccanica dei dotti biliari, alla perdita di polarità delle cellule biliari e/o all'invasione precoce dei vasi sanguigni <sup>125</sup>.

Il nostro studio è il primo presente in letteratura che indaga il valore diagnostico del dosaggio sierico di MUC 5 AC comparato con CEA e CA 19.9 in gruppi di pazienti con colangiocarcinoma intraepatico e periiliare, in pazienti con patologia litiasica della colecisti, in pazienti con epatoliti e stenosi infiammatorie, in pazienti con neoplasie primitive e secondarie epatiche e in un gruppo di controllo senza patologie litiasiche e neoplastiche. Abbiamo dimostrato il valore diagnostico di questo test sia come valore medio assoluto sia con l'analisi delle curve ROC. Questo test può rappresentare uno strumento clinico utile nella diagnosi differenziale dei pazienti affetti da patologie neoplastiche e infiammatorie dove le metodiche di imaging e il dosaggio del CA 19.9 non sono in grado di fornire risultati affidabili in tutti i casi.

Nella seconda fase del nostro studio abbiamo valutato il valore prognostico del dosaggio sierico di MUC 5 AC nei pazienti affetti da colangiocarcinoma. Sebbene la numerosità del campione non permetta di formulare considerazioni conclusive, abbiamo evidenziato come il valore sierico di MUC 5 AC sia correlato allo stadio di malattia. Valori significativamente più elevati si sono riscontrati nei pazienti con malattia metastatica. Nella successiva analisi di sopravvivenza abbiamo confrontato i valori di sopravvivenza per i pazienti sottoposti a resezione ad intento radicale. I pazienti con valori inferiori a 13 ng/ml hanno mostrato una sopravvivenza maggiore nei confronti dei pazienti con MUC 5AC maggiore di 13 ng/ml. La differenza non è stata statisticamente significativa probabilmente per la bassa numerosità del campione.

## **CONCLUSIONI**

Il nostro studio, sebbene abbia bassa numerosità, consente di delineare il ruolo del dosaggio sierico di MUC 5 AC come nuovo marker sierico nel colangiocarcinoma intraepatico e peri-ilare.

Il dosaggio sierico di MUC 5 AC consente di differenziare i pazienti con colangiocarcinoma da quelli con litiasi biliare, con stenosi infiammatorie e con altre neoplasie epatiche primitive e secondarie.

Il dosaggio sierico di MUC 5 AC sembra avere anche un ruolo prognostico nei pazienti affetti da colangiocarcinoma, valori più elevati si associano a uno stadio più avanzato di malattia e nei pazienti sottoposti a resezione sembra si associ alla sopravvivenza a lungo termine.

I dati preliminari di questo studio dovranno essere confermati in un campione con maggiore numerosità.

**BIBLIOGRAFIA**

1. De Groen PC, Gores GJ, LaRusso NF, et al. Biliary tract cancers. *N Engl J Med* 1999; 341(18):1368-78.
2. Patel T. Cholangiocarcinoma. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3(1):33-42.
3. Khan SA, Davidson BR, Goldin R, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: consensus document. *Gut* 2002; 51 Suppl 6:VI1-9.
4. Sandhu DS, Roberts LR. Diagnosis and management of cholangiocarcinoma. *Curr Gastroenterol Rep* 2008; 10(1):43-52.
5. Nishio H, Nagino M, Oda K, et al. TNM classification for perihilar cholangiocarcinoma: comparison between 5th and 6th editions of the AJCC/UICC staging system. *Langenbecks Arch Surg* 2005; 390(4):319-27.
6. Nakeeb A, Pitt HA, Sohn TA, et al. Cholangiocarcinoma. A spectrum of intrahepatic, perihilar, and distal tumors. *Ann Surg* 1996; 224(4):463-73; discussion 473-5.
7. Japan TLCSGo. Classification of primary liver cancer. 1st edn. ed. Tokyo: Kaneara, 2004.
8. Aishima S, Kuroda Y, Nishihara Y, et al. Proposal of progression model for intrahepatic cholangiocarcinoma: clinicopathologic differences between hilar type and peripheral type. *Am J Surg Pathol* 2007; 31(7):1059-67.
9. Jarnagin WR, Bowne W, Klimstra DS, et al. Papillary phenotype confers improved survival after resection of hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 2005; 241(5):703-12; discussion 712-4.
10. Sakamoto E, Nimura Y, Hayakawa N, et al. The pattern of infiltration at the proximal border of hilar bile duct carcinoma: a histologic analysis of 62 resected cases. *Ann Surg* 1998; 227(3):405-11.
11. Shaib Y, El-Serag HB. The epidemiology of cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis* 2004; 24(2):115-25.
12. Shaib YH, Davila JA, McGlynn K, El-Serag HB. Rising incidence of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a true increase? *J Hepatol* 2004; 40(3):472-7.



13. Taylor-Robinson SD, Toledano MB, Arora S, et al. Increase in mortality rates from intrahepatic cholangiocarcinoma in England and Wales 1968-1998. *Gut* 2001; 48(6):816-20.
14. Khan SA, Toledano MB, Taylor-Robinson SD. Epidemiology, risk factors, and pathogenesis of cholangiocarcinoma. *HPB (Oxford)* 2008; 10(2):77-82.
15. Patel T. Worldwide trends in mortality from biliary tract malignancies. *BMC Cancer* 2002; 2:10.
16. Lazaridis KN, Gores GJ. Cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 2005; 128: 1655-1667.
17. Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. Cholangiocarcinoma. *Lancet* 2005; 366: 3-1314 .
18. Iwai N, Yanagihara J, Tokiwa K, Shimotake T, Nakamura K. Congenital choledochal dilatation with emphasis on pathophysiology of the biliary tract. *Ann Surg* 1992; 215: 27-30.
19. Walker NJ, Crockett PW, Nyska A, Brix AE, Jokinen MP, Sells DM, Hailey JR, Easterling M, Haseman JK, Yin M, Wyde ME, Bucher JR, Portier CJ. Dose-additive carcinogenicity of a defined mixture of "dioxin-like compounds". *Environ Health Perspect* 2005; 113: 43-48.
20. Bond GG, McLaren EA, Sabel FL, Bodner KM, Lipps TE, Cook RR. Liver and biliary tract cancer among chemical workers. *Am J Ind Med* 1990; 18: 19-24.
21. Rubel LR, Ishak KG. Thorotrast-associated cholangiocarcinoma: an epidemiologic and clinicopathologic study. *Cancer* 1982; 50: 1408-1415.
22. Carriaga MT, Henson DE. Liver, gallbladder, extrahepatic bile ducts, and pancreas. *Cancer* 1995; 75: 171-190.
23. Nichols JC, Gores GJ, LaRusso NF, Wiesner RH, Nagorney DM, Ritts RE Jr. Diagnostic role of serum CA 19-9 for cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis. *Mayo Clin Proc* 1993; 68: 874-879.
24. Patel AH, Harnois DM, Klee GG, LaRusso NF, Gores GJ. The utility of CA 19-9 in the diagnoses of cholangio-carcinoma in patients without primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 204-207.
25. Teefey SA, Baron RL, Rohrmann CA, Shuman WP, Freeny PC. Sclerosing cholangitis: CT findings. *Radiology* 1988; 169: 635-639.

26. Zhang Y, Uchida M, Abe T, Nishimura H, Hayabuchi N, Nakashima Y. Intrahepatic peripheral cholangiocarcinoma: comparison of dynamic CT and dynamic MRI. *J Comput Assist Tomogr* 1999; 23: 670-677.
27. Fritscher-Ravens A, Broering DC, Sriram PV, Topalidis T, Jaeckle S, Thonke F, Soehendra N. EUS-guided fine-needle aspiration cytodiagnosis of hilar cholangiocarcinoma: a case series. *Gastrointest Endosc* 2000; 52: 534-540.
28. Fritscher-Ravens A, Broering DC, Knoefel WT, Rogiers X, Swain P, Thonke F, Bobrowski C, Topalidis T, Soehendra N. EUS-guided fine-needle aspiration of suspected hilar cholangiocarcinoma in potentially operable patients with negative brush cytology. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 45-51.
29. Fritscher-Ravens A, Bohuslavizki KH, Broering DC, Jenicke L, Schafer H, Buchert R, Rogiers X, Clausen M. FDG PET in the diagnosis of hilar cholangiocarcinoma. *Nucl Med Commun* 2001; 22: 1277-1285.
30. Sobin LH, Wittekind C (eds). *TNM classification of malignant tumours, (intrahepatic cholangiocarcinoma) 6<sup>th</sup> edn.* 2002; New York: Wiley-Liss.
31. Sobin LH, Wittekind C (eds). *TNM classification of malignant tumours, 7<sup>th</sup> edn.* 2010; New York: Wiley-Liss.
32. Liver Cancer Study Group of Japan. *General rules for clinical and pathological study of primary liver cancer, 2<sup>nd</sup> English edn.* 2003; Tokyo: Kanehara.
33. Jarnagin WR, Fong Y, DeMatteo RP, et al. Staging, resectability, and outcome in 225 patients with hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 2001; 234(4):507-17; discussion 517-9.
34. Bismuth H, Nakache R, Diamond T. Management strategies in resection for hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 1992; 215(1):31-8.
35. Gazzaniga G, Gaggiani A, Bonanza G. Classificazione anatomico-chirurgica dei tumori dell'ilo epatico. *Notiz Chir* 1984; 5:128-129.
36. Greene F, Page D, Fleming I, et al. *AJCC cancer staging manual, 6<sup>th</sup> edn.* Berlin Heidelberg New York: Springer, 2002.
37. Sobin LH, Wittekind C (eds). *TNM classification of malignant tumours, (hilar cholangiocarcinoma) 6<sup>th</sup> edn.* 2002; New York: Wiley-Liss.
38. Japanese Society of Biliary Surgery. *Classification of biliary tract carcinoma, 2<sup>nd</sup> English edn.* 2004; Tokyo: Kanehara.

39. Ikai I, Arii S, Ichida T et al. Report of the 16th follow-up survey of primary liver cancer. *Hepatol Res* 2005; 32 (3): 163-172.
40. Yamasaki S. Intrahepatic cholangiocarcinoma: macroscopic type and stage classification. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10 (4): 288-291.
41. Sasaki A, Aramaki M, Kawano K et al. Intrahepatic peripheral cholangiocarcinoma: mode of spread and choice of surgical treatment. *Br J Surg* 1998; 85 (9): 1206-1209.
42. Yamamoto M, Takasaki K, Yoshikawa T. Extended resection for intrahepatic cholangiocarcinoma in Japan. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1999; 6 (2): 117-121.
43. Yamamoto M, Takasaki K, Yoshikawa T et al. Does gross appearance indicate prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma? *J Surg Oncol* 1998; 69 (3): 162-167.
44. Uenishi T, Yamazaki O, Yamamoto T et al. Serosal invasion in TNM staging of mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005; 12 (6): 479-483.
45. Suh KS, Roh HR, Koh YT et al. clinicopathologic features of the intraductal growth type of peripheral cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2000; 31 (1): 12-17.
46. Ohashi K, Nakajima Y, Kanehiro H et al. Ki-ras mutations and p53 protein expressions in intrahepatic cholangiocarcinomas: relation to gross tumor morphology. *Gastroenterology* 1995; 109 (5): 1612-1617.
47. Yeh CN, Jan YY, Yeh TS et al. Hepatic resection of the intraductal papillary type of peripheral cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2004; 11 (6):606-611.
48. Sakamoto E, Hayakawa N, Kamiya J et al. Treatment strategy for mucin-producing intrahepatic cholangiocarcinoma: value of percutaneous transhepatic biliary drainage and cholangioscopy. *World J Surg* 1999; 23 (10): 1038-1043.
49. Isa T, Kusano T, Shimoji H et al. Predictive factors for long-term survival in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Am J Surg* 2001; 181 (6): 507-511.
50. Morimoto Y, Tanaka Y, Ito T et al. Long-term survival and prognostic factors in the surgical treatment for intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10 (6): 432-440.

51. Suzuki S, Sakaguchi T, Yokoi Y et al. Clinicopathological prognostic factors and impact of surgical treatment of mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Surg* 2002; 26 (6): 687-693.
52. Nozaki Y, Yamamoto M, Ikai I et al. Reconsideration of the lymph-node metastasis pattern (N factor) from intrahepatic cholangiocarcinoma using the International Union Against Cancer TNM staging system for primary liver carcinoma. *Cancer* 1998; 83 (9): 1923-1929.
53. Isaji S, Kawarada Y, Taoka H et al. Clinicopathological features and outcome of hepatic resection for intrahepatic cholangiocarcinoma in Japan. *Hepatobiliary Pancreat Surg* 1999; 6 (2): 108-116.
54. Okabayashi T, Yamamoto J, Kosuge T et al. A new staging system for mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma: analysis of preoperative and post operative variables. *Cancer* 2001; 92 (9): 2374-2383.
55. Nakagawa T, Kamiyama T, Kurauchi N et al. Number of lymph-node metastases is a significant prognostic factor in intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Surg* 2005; 29 (6): 728-733.
56. Yamanaka N, Okamoto E, Ando T et al. Clinicopathologic spectrum of resected extraductal mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer* 1995; 76 (12): 2449-2456.
57. Cherqui D, Tantawi B, Alon R et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma. Results of aggressive surgical management. *Arch Surg* 1995; 130 (10): 1073-1078.
58. Miwa S, Miyagawwa S, Kobayashi A et al. Predictive factors for intrahepatic cholangiocarcinoma recurrence in the liver following surgery. *J Gastroenterol* 2006; 41 (9): 893-900.
59. Uenishi T, Hirobashi K, Kubo S et al. Clinicopathologic factors predicting outcome after resection of mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma. *Br J Surg* 2001; 88 (7): 969-974.
60. Nakagohri T, Asano T, Kinoshita H et al. Aggressive surgical resection for hilar-invasive and peripheral intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Surg* 2003; 27 (3): 289-293.
61. Nakanuma Y, Harada K, Ishikawa A et al. Anatomic and molecular pathology of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10 (4): 265-281.
62. Hoang MP, Murakata LA, Katabi N et al. Invasive papillary cacinomas of extrahepatic bile ducts: clinicopathologic and immunohistochemical study of 13 cases. *Mod Pathol* 2002; 15 (12): 1251-1258.

63. Hong SM, Cho H, Moskaluk CA, Yu E. Measurement of the invasion depth of extrahepatic bile duct carcinoma: an alternative method overcoming the current T classification problems of the AJCC staging system. *Am J Surg Pathol* 2007; 31 (2): 199-206.
64. Neuhaus P, Jonas S, Bechstein WO et al. Extended resections for hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 1999; 230 (6): 808-818.
65. Hong SM, Kim MJ, Pi DY et al. Analysis of extrahepatic bile duct carcinomas according to the New American Joint Committee on Cancer staging system focused on tumor classification problems in 222 patients. *Cancer* 2005; 104 (4): 802-810.
66. Iwatsuki S, Todo S, Marsh JW et al. Treatment of hilar cholangiocarcinoma (Klatskin tumours) with hepatic resection or transplantation. *J Am Coll Surg* 1998; 187 (4): 358-364.
67. Miyazaki M, Ito H, Nagakawa K et al. Parenchyma-preserving hepatectomy in the surgical treatment of hilar cholangiocarcinoma. *J Am Coll Surg* 1999; 189 (6): 575-583.
68. Kosuge t, Yamamoto J, Shimada K et al. Improved surgical results for hilar cholangiocarcinoma with procedures including major hepatic resection. *Ann Surg* 1999; 230 (5): 663-671.
69. Jarnagin WR, Shoup M. Surgical management of cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis* 2004; 24 (2): 189-199.
70. Launois B, Terblanche J, Lakehal M et al. Proximal bile duct cancer: high resectability rate and 5-year survival. *Ann Surg* 1999; 230 (2): 266-275.
71. Dinant S, Gerhards MF, Rauws EA, et al. Improved outcome of resection of hilar cholangiocarcinoma (Klatskin tumor). *Ann Surg Oncol* 2006; 13(6):872-80.
72. Kondo S, Hirano S, Ambo Y, et al. Forty consecutive resections of hilar cholangiocarcinoma with no postoperative mortality and no positive ductal margins: results of a prospective study. *Ann Surg* 2004; 240(1):95-101.
73. Ebata T, Nagino M, Kamiya J et al. Hepatectomy with portal vein resection for hilar cholangiocarcinoma: audit of 52 consecutive cases. *Ann Surg* 2003; 238 (5):720-727.
74. Liu FX, Zhang H, Zhu SG et al. Correlation of p53 gene mutation and expression of P53 protein in cholangiocarcinoma. *World J Surg* (2006); 12 (29); 4706-4709.

75. Lang H, Sotiropoulos GC, Fruhauf NR, et al. Extended hepatectomy for intrahepatic cholangiocellular carcinoma (ICC): when is it worthwhile? Single center experience with 27 resections in 50 patients over a 5-year period. *Ann Surg* 2005; 241(1):134-43.
76. Yamanaka N, Okamoto E, Ando T, et al. Clinicopathologic spectrum of resected extraductal mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer* 1995; 76(12):2449-56.
77. Ohtsuka M, Ito H, Kimura F, et al. Results of surgical treatment for intrahepatic cholangiocarcinoma and clinicopathological factors influencing survival. *Br J Surg* 2002; 89(12):1525-31.
78. Nakagawa T, Kamiyama T, Kurauchi N, et al. Number of lymph node metastases is a significant prognostic factor in intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Surg* 2005; 29(6):728-33.
79. Morimoto Y, Tanaka Y, Ito T, et al. Long-term survival and prognostic factors in the surgical treatment for intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10(6):432-40.
80. Kawarada Y, Yamagiwa K, Das BC. Analysis of the relationships between clinicopathologic factors and survival time in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Am J Surg* 2002; 183(6):679-85.
81. Weber SM, Jarnagin WR, Klimstra D, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: resectability, recurrence pattern, and outcomes. *J Am Coll Surg* 2001; 193(4):384-91.
82. Yamamoto M, Takasaki K, Yoshikawa T. Extended resection for intrahepatic cholangiocarcinoma in Japan. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1999; 6(2):117-21.
83. Suzuki S, Sakaguchi T, Yokoi Y, et al. Clinicopathological prognostic factors and impact of surgical treatment of mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Surg* 2002; 26(6):687-93.
84. Nimura Y. Radical surgery: vascular and pancreatic resection for cholangiocarcinoma. *HPB (Oxford)* 2008; 10(3):183-5.
85. Isaji S, Kawarada Y, Taoka H, et al. Clinicopathological features and outcome of hepatic resection for intrahepatic cholangiocarcinoma in Japan. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1999; 6(2):108-16.
86. Huang JL, Biehl TR, Lee FT, et al. Outcomes after resection of cholangiocellular carcinoma. *Am J Surg* 2004; 187(5):612-7.
87. Ikai I, Arii S, Ichida T, et al. Report of the 16th follow-up survey of primary liver cancer. *Hepatol Res* 2005; 32(3):163-72.

88. Miwa S, Miyagawa S, Kobayashi A, et al. Predictive factors for intrahepatic cholangiocarcinoma recurrence in the liver following surgery. *J Gastroenterol* 2006; 41(9):893-900.
89. Nagakawa T, Kayahara M, Ikeda S, et al. Biliary tract cancer treatment: results from the Biliary Tract Cancer Statistics Registry in Japan. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9(5):569-75.
90. Hemming AW, Reed AI, Fujita S, et al. Surgical management of hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 2005; 241(5):693-9; discussion 699-702.
91. Capussotti L, Vigano L, Ferrero A, Muratore A. Local surgical resection of hilar cholangiocarcinoma: Is there still a place? *HPB (Oxford)* 2008; 10(3):174-8.
92. Ito F, Agni R, Rettammel RJ, et al. Resection of hilar cholangiocarcinoma: concomitant liver resection decreases hepatic recurrence. *Ann Surg* 2008; 248(2):273-9.
93. Kosuge T, Yamamoto J, Shimada K, et al. Improved surgical results for hilar cholangiocarcinoma with procedures including major hepatic resection. *Ann Surg* 1999; 230(5):663-71.
94. Neuhaus P, Jonas S, Bechstein WO, et al. Extended resections for hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 1999; 230(6):808-18; discussion 819.
95. Nimura Y, Kamiya J, Kondo S, et al. Aggressive preoperative management and extended surgery for hilar cholangiocarcinoma: Nagoya experience. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000; 7(2):155-62.
96. Nagino M, Kamiya J, Arai T, et al. "Anatomic" right hepatic trisectionectomy (extended right hepatectomy) with caudate lobectomy for hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 2006; 243(1):28-32.
97. Seyama Y, Kubota K, Sano K, et al. Long-term outcome of extended hemihepatectomy for hilar bile duct cancer with no mortality and high survival rate. *Ann Surg* 2003; 238(1):73-83.
98. Nimura Y, Hayakawa N, Kamiya J, et al. Hepatic segmentectomy with caudate lobe resection for bile duct carcinoma of the hepatic hilus. *World J Surg* 1990; 14(4):535-43; discussion 544.
99. Jarnagin WR. Cholangiocarcinoma of the extrahepatic bile ducts. *Semin Surg Oncol* 2000; 19(2):156-76.
100. Sugiura Y, Nakamura S, Iida S, et al. Extensive resection of the bile ducts combined with liver resection for cancer of the main hepatic

- duct junction: a cooperative study of the Keio Bile Duct Cancer Study Group. *Surgery* 1994; 115(4):445-51.
101. Sano T, Shimada K, Sakamoto Y, et al. One hundred two consecutive hepatobiliary resections for perihilar cholangiocarcinoma with zero mortality. *Ann Surg* 2006; 244(2):240-7.
  102. Seyama Y, Makuuchi M. Current surgical treatment for bile duct cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13(10):1505-15.
  103. Su CH, Tsay SH, Wu CC, et al. Factors influencing postoperative morbidity, mortality, and survival after resection for hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 1996; 223(4):384-94.
  104. Nagino M, Kamiya J, Uesaka K, et al. Complications of hepatectomy for hilar cholangiocarcinoma. *World J Surg* 2001; 25(10):1277-83.
  105. Nagino M, Nishio H, Ebata T, et al. Intrahepatic cholangiojejunostomy following hepatobiliary resection. *Br J Surg* 2007; 94(1):70-7.
  106. A. Guglielmi, A. Ruzzenente, C. Iacono (eds). *Surgical Treatment of Hilar and ICC*. Springer Publ 2008; pp 116-117.
  107. Miyazaki M, Kimura F, Shimizu H, et al. Recent advance in the treatment of hilar cholangiocarcinoma: hepatectomy with vascular resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2007; 14(5):463-8.
  108. Urahashi T, Yamamoto M, Ohtsubo T, et al. Hepatopancreatoduodenectomy could be allowed for patients with advanced intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatogastroenterology* 2007; 54(74):346-9.
  109. Nagino M, Kamiya J, Arai T, et al. One hundred consecutive hepatobiliary resections for biliary hilar malignancy: preoperative blood donation, blood loss, transfusion, and outcome. *Surgery* 2005; 137(2):148- 55.
  110. Kurosaki I, Hatakeyama K. Repeated hepatectomy for recurrent intrahepatic cholangiocarcinoma: report of two cases. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2005 Jan;17(1):125-30.
  111. Ong SL, Sachdeva A, Garcea G et al.: Elevation of carbohydrate antigen 19.9 in benign hepatobiliary conditions and its correlation with serum bilirubin concentration. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 3213-3217.
  112. Marrelli D, Caruso S, Pedrazzani C et al.: CA 19-9 serum levels in obstructive jaundice: clinical value in benign and malignant conditions. *Am J Surg* 2009; 198: 333-339.



113. Kim BJ, Lee KT, Moon TG et al.: How do we interpret an elevated carbohydrate antigen 19-9 level in asymptomatic subjects? *Dig Liver Dis.* 2009; 41: 364-369.
114. Kim H-R, Lee C-H, Kim YW et al.: Increased CA 19-9 level in patient without malignant disease. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 750-754.
115. Morris-Stiff G, Teli M, Jardine N et al.: CA 19-9 antigen levels can distinguish between benign and malignant pancreatobiliary disease. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 620-626.
116. Jhon AR, Haghghi KS, Taniere P et al.: Is a raised CA 19-9 level diagnostic for a cholangiocarcinoma in patients with no history of sclerosing cholangitis?. *Dig.Surg.* 2006; 23: 319-324.
117. Andrianifahanana M, Moniaux N, Batra SK.: Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1765: 189-222.
118. Sasaki M, Ikeda H, Nakanuma Y.: Expression profiles of MUC mucines and trefoil factors family ( TFF ) peptides in the intrahepatic biliary system: physiological distribution and pathological significance. *Prog Histochem Cytochem.* 2007; 42: 61-110.
119. Sheenan JK, Kirkham S, Howard M et al.: Identification of Molecular Intermediates in the Assembly Pathway of the MUC5AC Mucin. *J Biol Chem.* 2004; 279: 15698-15705.
120. Kim GE, Bae HI, Park HU et al.: Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucins and sialyl Tn antigen in intraepithelial neoplasm of the pancreas. *Gastroenterology* 2002; 123: 1052-1060.
121. Vandenhoute B, Buisine M-P, Debailleul V et al. : Mucin gene expression in biliary epithelial cells. *J Hepatol* 1997; 237: 1057-1066.
122. Lee KT, Liu TS: Altered Mucin Gene Expression in Stone-Containing Intrahepatic Bile Ducts and Cholangiocarcinomas. *Dig Dis Sci.* 2001; 46: 2166-2172.
123. Ishikawa A, Sasaki M, Ohira S et al.: Aberrant expression of CDX2 is closely related to the intestinal metaplasia and MUC2 expression in intraductal papillary neoplasm of the liver in hepatolithiasis. *Lab Invest.* 2004; 84: 629-638.
124. Aishima S, Kuroda Y, Nishihara Y et al.: Gastric mucins phenotype defines tumor progression and prognosis of intrahepatic cholangiocarcinoma: gastric foveolar type is associated with aggressive tumor behaviour. *Hepatol Res.* 2006; 36: 188-194.

125. Bamrungphon W, Prempracha N, Bunchu N et al.: A new mucin antibody/enzyme-linked lectin-sandwich assay of serum MUC5AC mucin for the diagnosis of cholangiocarcinoma. *Cancer Lett.* 2007; 247: 301-308.
126. Boonla C, Wongkham S, Sheenan JK et al.: Prognostic value of serum MUC5AC mucin in patients with cholangiocarcinoma. *Cancer* 2003; 98: 1438-1443.
127. Wongkham S, Sheenan JK, Boonla C et al.: Serum MUC5ACA mucin as a potential marker for cholangiocarcinoma. *Cancer Lett.* 2003; 195: 93-99.
128. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1996. *CA Cancer J Clin* 1996; 46:5-27.
129. Gores GJ.: Cholangiocarcinoma: Current Concepts and Insights. *Hepatology* 2003; 37 961-969.

## RINGRAZIAMENTI

Un sentito ringraziamento a tutti coloro che hanno reso possibile la realizzazione di questa tesi di dottorato, in particolar modo a

Orazio Ruzzenente, Silvia Pachera, Gianluca Salvagno, Manuela Ottoboni, Francesca Bertuzzo.