

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA



Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche

CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA

Anno accademico 2022-2023

**“Ruolo prognostico del tumor budding
nel carcinoma dell’esofago e della
giunzione esofago-gastrica”**

Relatore: Prof. Luca Mastracci

Candidata: Mila Gualandri

Sommario

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA	1
Relatore: Prof. Luca Mastracci	1
Candidata: Mila Gualandri	1
ABSTRACT	4
INTRODUZIONE.....	5
1) ADENOCARCINOMA DELL'ESOFAGO e DELLA GIUNZIONE GASTROESOFAGEA	9
A. GENERALITÀ ANATOMICHE	9
B. EPIDEMIOLOGIA	10
C. FATTORI DI RISCHIO.....	14
1. Malattia da reflusso gastroesofageo (GERD)	14
2. <i>Obesità</i>	18
3. <i>Esofago di Barrett</i>	18
4. <i>Displasia in esofago</i>	20
D. INQUADRAMENTO DIAGNOSTICO	22
1. INQUADRAMENTO DIAGNOSTICO NELL'ADENOCARCINOMA DELL'ESOFAGO	22
2. INQUADRAMENTO DIAGNOSTICO NEGLI ADENOCARCINOMI DELLA GIUNZIONE ESOFAGO-GASTRICA	25
E. CLASSIFICAZIONE MOLECOLARE.....	27
F. FATTORI PROGNOSTICI	30
2) RUOLO DEGLI ISTOTIPI NELLA PROGNOSI.....	31
3) OBIETTIVI DELLO STUDIO: TUMOR BUDDING COME FATTORE PROGNOSTICO.....	35
4) TUMOR BUDDING.....	35
A. METODI DI VALUTAZIONE DEL TUMOR BUDDING.....	38
5) MATERIALI	42
A. SELEZIONE DEI CAMPIONI	42
B. RACCOLTA DEI DATI CLINICI.....	42
C. COLORAZIONE	43
D. ANALISI STATISTICHE	43
6) RISULTATI.....	44
A. CASISTICA.....	44
B. BUDDING	44
C. CORRELAZIONE BUDDING E SOPRAVVIVENZA.....	45
D. CORRELAZIONE BUDDING E ISTOTIPO (adenocarcinoma ghiandolare ben differenziato vs adenocarcinoma ghiandolare poco differenziato).....	48

E. CORRELAZIONE BUDDING E STADIO	49
F. CORRELAZIONE DELLE VARIABILI CLINICO-PATOLOGICHE E SOPRAVVIVENZA	50
7) DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	51
Bibliografia.....	53

ABSTRACT

Un recente lavoro multicentrico su 299 adenocarcinomi dell'esofago e della giunzione esofago-gastrica sottoposti ad intervento chirurgico senza terapia neoadiuvante ha dimostrato che un algoritmo diagnostico basato sugli aspetti morfologici delle neoplasie ha un significativo impatto prognostico consentendo di distinguere gli adenocarcinomi a rischio più basso (cancer specific survival 66.3% a 5 anni) e gli adenocarcinomi a rischio più alto (cancer specific survival 36.1% a 5 anni).

Il Tumor budding (TB) è un tipo specifico di pattern di crescita invasivo (definito come invasione in singole cellule o in cluster non superiori a 4 cellule) ed è un importante parametro prognostico nei carcinomi gastrointestinali, in particolare nell'adenocarcinoma del colon-retto.

Gli scopi dello studio sono valutare la prevalenza del TB negli adenocarcinomi ghiandolari dell'esofago e della giunzione esofago-gastrica ed il suo impatto sulla sopravvivenza.

Il TB è stato analizzato su 215 casi di adenocarcinoma ghiandolare ben differenziato (WD) e poco differenziato (PD). È stato raggruppato secondo i criteri ITBCC in: Bd1 (0-4 buds), Bd2 (5-9 buds), e Bd3 (10 o più buds).

Il cut off del n° di buds prognosticamente più significativo è stato definito mediante l'analisi delle ROC curves. L'analisi della sopravvivenza cancro specifica (CSS) è stata valutata mediante metodo di Kaplan–Meier e analisi della regressione di Cox.

Utilizzando le 3 categorie proposte da ITBCC per la valutazione del TB, il budding di alto grado (Bd3) è risultato essere più frequente negli adenocarcinomi PD ed è significativamente correlato alla sopravvivenza in analisi univariata ($p=0.006$), ma perde di significatività in analisi multivariata.

L'analisi delle ROC curves ha identificato in 8 buds/campo ($0,785 \text{ mm}^2$) il valore cut off più informativo in relazione alla sopravvivenza. La frequenza di TB elevato (>8 buds per campo) è maggiore negli adenocarcinomi dell'esofago e della giunzione esofago-gastrica PD (84/124 - 68%) rispetto ai WD (7/91 - 8%, $p<0.001$). Utilizzando tale valore cut-off, il TB è risultato essere un fattore prognostico negativo sia in analisi univariata ($p<0.0001$) sia in analisi multivariata ($p<0.001$).

INTRODUZIONE

I tumori esofagogastrici rappresentano un gruppo eterogeneo di neoplasie complessivamente responsabili di circa 1 milione di decessi all'anno, rappresentando la seconda causa di morte cancro-correlata in tutto il mondo (Sung et al., 2021).

Tra questi, il carcinoma dell'esofago rappresenta, a livello mondiale, l'ottava neoplasia per frequenza e la sesta causa di morte cancro-correlata (Domper Arnal et al., 2015).

L'adenocarcinoma della giunzione gastroesofagea (GEJA), negli ultimi decenni, ha quasi triplicato la sua incidenza nei paesi occidentali (Hur et al., 2013), acquistando una maggiore importanza in termini di salute pubblica.

L'età media d'insorgenza di queste neoplasie è intorno ai 65 anni.

Interessano più frequentemente soggetti di sesso maschile, razza caucasica e classe sociale elevata (Siegel et al., 2015). Il motivo è da attribuirsi all'elevata frequenza, nei paesi occidentali, della malattia da reflusso gastroesofageo (GERD) e della sua più temibile complicanza, ovvero l'esofago di Barrett che, ad oggi, rappresenta il principale precursore di queste neoplasie.

Il problema di questi tumori, oltre alla frequenza, è la loro aggressività biologica e nonostante alcuni miglioramenti nelle terapie, il tasso di sopravvivenza globale a cinque anni rimane comunque intorno al 15% (Hur et al., 2013).

In Italia la sopravvivenza a 5 anni per l'adenocarcinoma della giunzione esofago-gastrica è del 12% nei maschi e del 17% nelle femmine.

La mortalità per l'adenocarcinoma esofageo si attesta intorno a 3-5 casi su 100.000 mila abitanti, con un numero di decessi maggiore di 6-7 volte nel sesso maschile (*AIOM / Associazione Italiana di Oncologia Medica – Official Website, s.d.*).

I principali fattori prognostici nell'adenocarcinoma dell'esofago e della giunzione esofago-gastrica sono rappresentati dallo stadio TNM e dal profilo molecolare/molecolare surrogato. Entrambi questi parametri, oltre ad avere un fondamentale ruolo prognostico, sono alla base delle attuali scelte terapeutiche.

A questi due parametri se ne è aggiunto un terzo: la sottotipizzazione istologica che distingue fundamentalmente gli adenocarcinomi a rischio più basso (adenocarcinoma

ghiandolare ben differenziato, carcinoma mucinoso muconodulare e carcinoma diffuso desmoplastico) e gli adenocarcinomi a rischio più alto (adenocarcinoma ghiandolare di alto grado, adenocarcinoma mucinoso invasivo, adenocarcinoma diffuso anaplastico e adenocarcinoma di tipo misto) (Fiocca et al., 2021).

L'obiettivo della mia tesi è quello di valutare se il Tumor Budding possa avere un ruolo prognostico negli adenocarcinomi di tipo ghiandolare dell'esofago e della giunzione esofago-gastrica, sulla scorta di quanto accaduto per i carcinomi colon-rettali.

Infatti oggi il Tumor Budding, sulla base di numerose evidenze scientifiche, è considerato un predittore indipendente di metastasi linfonodali (LNM), di recidiva di malattia e di morte cancro-relata nei pazienti con carcinoma del colon-retto (CCR) (Haddad et al., 2021). Per questi motivi è stato inserito nelle linee guida e nei protocolli che regolano la pratica clinica di routine di questa neoplasia.

In letteratura sono già presenti degli studi sul TB negli adenocarcinomi dell'esofago e della giunzione esofago-gastrica, ma si tratta di pochi lavori, spesso basati su casistiche molto limitate, talora senza una caratterizzazione morfologica accurata delle neoplasie e senza utilizzare i criteri di Lugli, di norma applicati nell'adenocarcinoma colon-rettale (Lugli et al., 2017).

Al fine di raggiungere l'obiettivo, per il mio lavoro mi sono basata su una casistica multicentrica di 299 adenocarcinomi dell'esofago e della giunzione gastroesofagea, che sono stati raccolti da 7 centri tra il 1998 ed il 2016.

I tumori sono stati resecati chirurgicamente senza essere stati sottoposti a terapia neoadiuvante, in quanto potrebbe modificare la valutazione del budding.

I pazienti partecipanti allo studio sono stati valutati sulla base di:

1. dati demografici: età e sesso
2. dati clinici: classificazione topografica di Siewert, stadiazione clinico-strumentale pre-intervento, recidiva, overall survival, cancer specific survival
3. dati istologici: stadiazione patologica, numero di linfonodi, numero di linfonodi metastatici, lymphnode ratio, grado di differenziazione sec WHO 2019, percentuale

di componente solida poco differenziata, invasione vascolare, invasione perineurale e pattern di crescita sec Ming (espansivo vs infiltrativo)

4. il tumor budding, valutato da un patologo esperto su vetrini colorati con ematossilina & eosina e classificato secondo i criteri di Lugli utilizzati per l'adenocarcinoma colon-rettale.

Ai 299 casi rimasti, sono stati applicati due criteri di esclusione, trattati nell'ITBCC (Lugli et al., 2017):

- 1) l'istotipo: abbiamo scelto di considerare solo gli adenocarcinomi di tipo ghiandolare (244/299 – 80%). Questo perché, grazie all'esperienza ottenuta sul carcinoma del colonretto, si è visto che la valutazione del budding tumorale negli istotipi mucinoso e diffuso con cellule ad anello con castone, può risultare molto problematica, per la sospensione delle cellule tumorali in un pool ricco di mucina.
- 2) la presenza di una marcata componente infiammatoria granulocitaria sul fronte di crescita della neoplasia con lisi delle ghiandole neoplastiche. Questo perché l'infiammazione rende difficile poter distinguere le cellule tumorali distaccate e separate dalla neoplasia dai buds

In definitiva, il tumor budding è stato valutato su 215 casi, suddivisi, secondo la categorizzazione di Lugli, in:

- Bd1 (low) 0-4 buds, presente in 93 casi (\cong 43%)
- Bd2 (intermediate) 5-9 buds, presente in 46 casi (\cong 21%)
- Bd3 (high) > 10 buds, presente in 76 casi (\cong 35%)

Abbiamo quindi messo in correlazione il budding così ottenuto con la sopravvivenza, l'istotipo e lo stadio, dimostrando che:

- ~ esiste un'importante differenza, in termini di sopravvivenza, tra pazienti con Bd1-Bd2 rispetto a pazienti con Bd3 ($p=0.002$).

Nello specifico, l'analisi secondo le curve ROC ha evidenziato che un valore di buds pari a 8 è il miglior discriminante ai fini dell'identificazione di un cut-off prognostico statisticamente significativo. Infatti, se si distinguono i soggetti in base ad un buds <8 per campo ($0,785 \text{ mm}^2$) rispetto ad un buds >8 per campo ($0,785 \text{ mm}^2$), possiamo

notare una differenza cospicua nelle curve di sopravvivenza, a sfavore di questi ultimi ($p < 0.0001$).

- ~ un numero più alto di buds (soprattutto Bd3) è tendenzialmente associato ad un istotipo ghiandolare scarsamente differenziato (PD GL) e quindi maggiormente aggressivo ($p < 0.0001$)
- ~ un budding > 8 è riscontrato prevalentemente negli stadi 3 e 4 di malattia ($p = 0,007$)

Infine, abbiamo eseguito un'analisi sul significato prognostico delle diverse variabili clinico-patologiche e in analisi univariata, sono risultate statisticamente significative le seguenti variabili:

1. istotipo ghiandolare ben differenziato rispetto a quello poco differenziato ($p < 0.0001$)
2. pattern di crescita espansivo vs infiltrativo sec Ming ($p = 0.013$)
3. presenza di invasione vascolare ($p = 0.001$)
4. presenza di invasione perineurale ($p = 0.001$)
5. budding secondo la categorizzazione di Lugli ($p = 0.002$)
6. budding con valore cut off=8 ($p < 0.0001$)

In analisi multivariata hanno mantenuto un valore statisticamente significativo solo:

1. l'istotipo ghiandolare ben differenziato rispetto a quello poco differenziato ($p < 0.0001$)
2. l'invasione vascolare ($p = 0.001$)
3. l'invasione perineurale ($p = 0.001$)
4. il budding con valore cut off=8 ($p < 0.0001$)

In conclusione il Tumor budding è risultato essere un fattore prognostico negativo nell'adenocarcinoma dell'esofago e della giunzione esofago-gastrica, soprattutto quando viene distinto sulla base di un cut-off di riferimento di 8 buds/campo.

Pertanto, la sua valutazione dovrebbe essere aggiunta a quella degli altri fattori prognostici, quali: stadio, istotipo, invasione vascolare e perineurale.

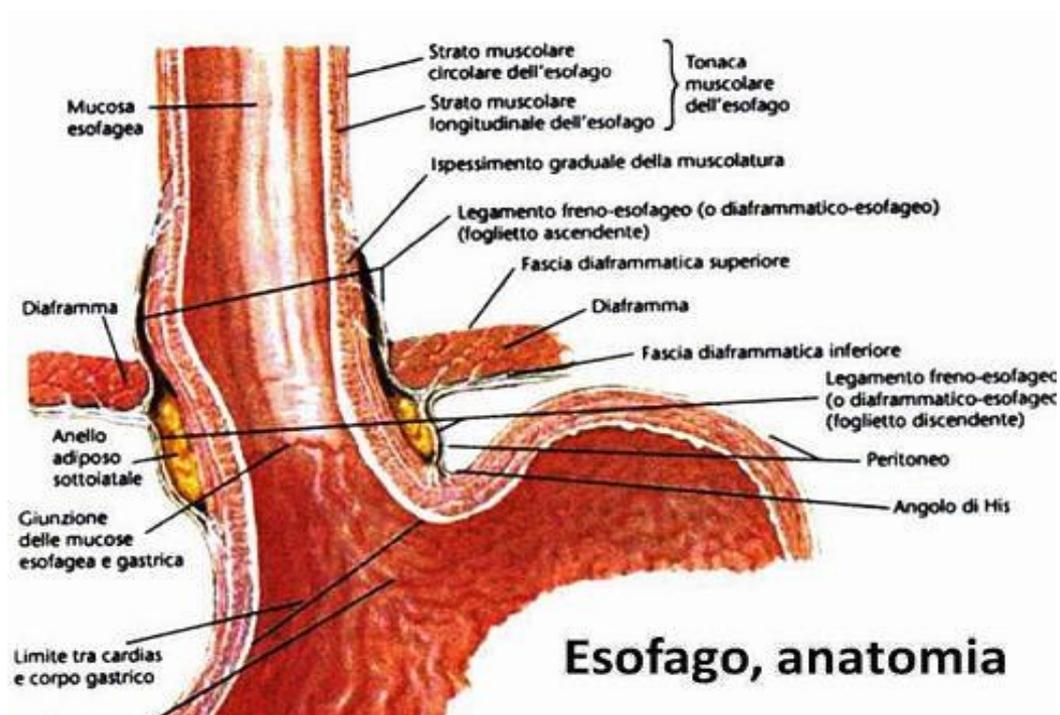
1) ADENOCARCINOMA DELL'ESOFAGO e DELLA GIUNZIONE GASTROESOFAGEA

A. GENERALITÀ ANATOMICHE

L'esofago è il segmento del canale alimentare interposto tra la faringe e lo stomaco.

Strutturalmente, l'esofago è un tubo fibromuscolare impari e paramediano.

La parete dell'esofago, partendo dal lume verso l'esterno, è costituita da tonaca mucosa, sottomucosa (tessuto connettivo), muscolare e avventizia.



La giunzione esofago-gastrica corrisponde macroscopicamente al punto in cui iniziano le pieghe longitudinali dello stomaco (linea Z).

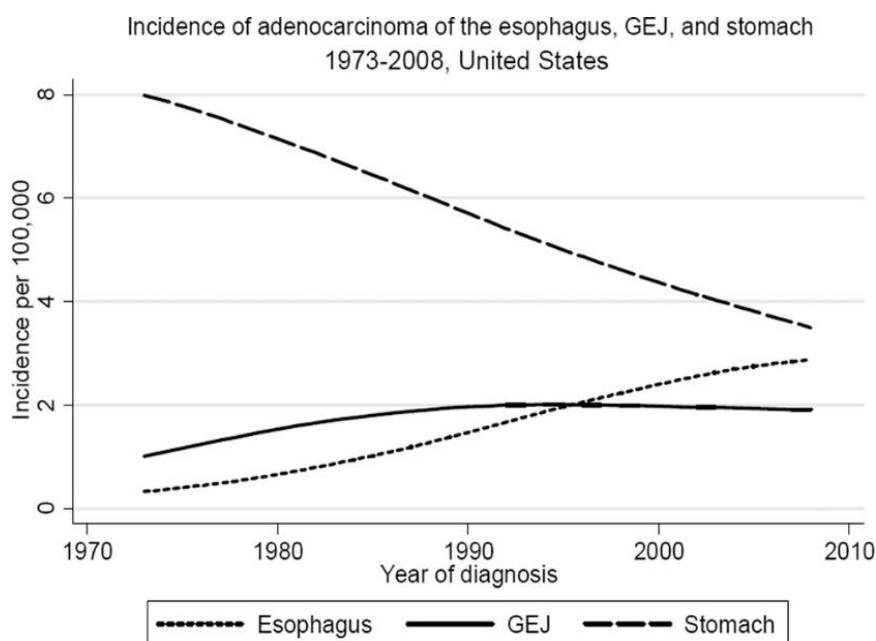
Invece, microscopicamente la giunzione è contraddistinta dal passaggio dall'epitelio squamoso pluristratificato della mucosa esofagea all'epitelio ghiandolare colonnare della mucosa gastrica (Huang, 2011).

Fisiologicamente il limite macroscopico dista da quello microscopico di un massimo di 0.5 cm.

B. EPIDEMIOLOGIA

Da un punto di vista epidemiologico i tumori dell'esofago si collocano all'8° posto, per frequenza, nel mondo, con un'incidenza complessiva di circa 3-4 casi/100.000 abitanti all'anno (Boys et al., 2015).

In passato era netta la dominanza dell'istotipo squamoso in tutto il mondo. Tuttavia, negli ultimi 30 anni, in alcuni paesi del Nord Europa e del Nord America, l'incidenza dell'adenocarcinoma (AE) è aumentata a tal punto da superare il carcinoma squamoso.

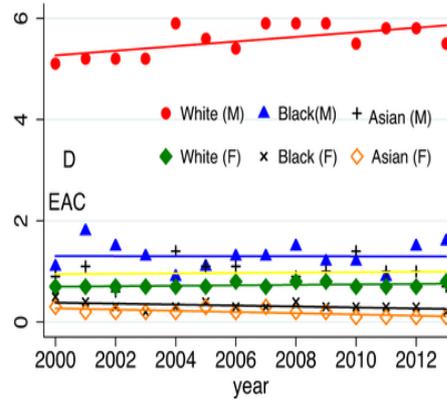
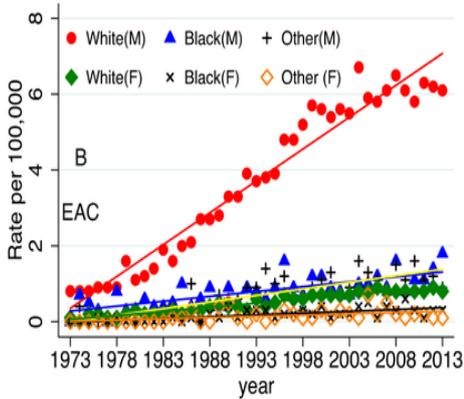
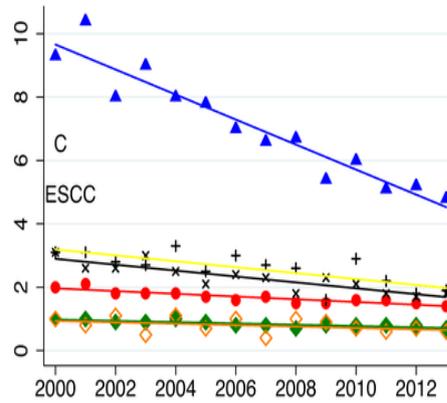
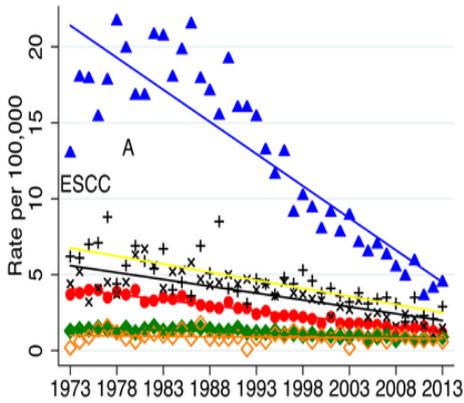
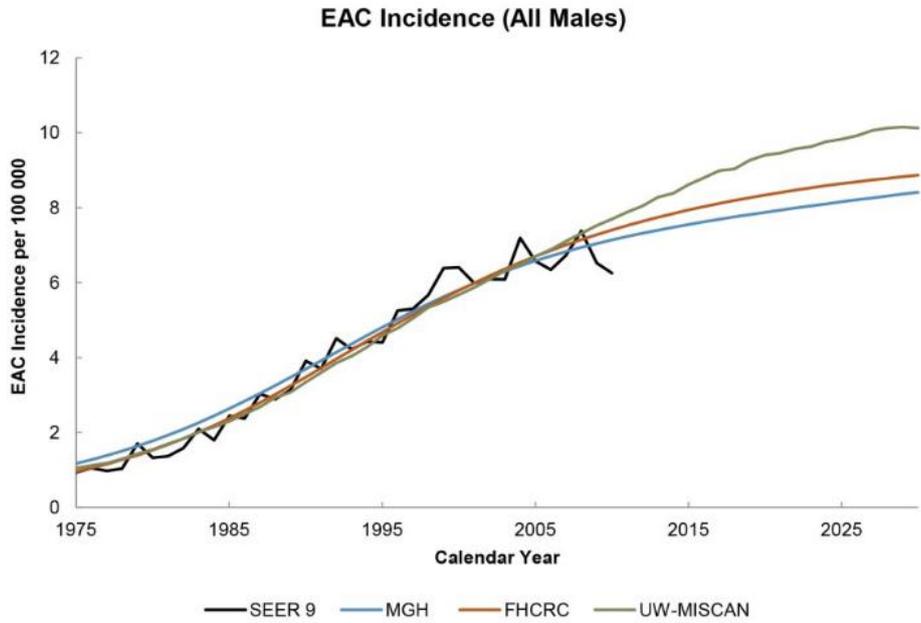


Per quanto concerne l'epidemiologia dell'adenocarcinoma della giunzione gastroesofagea (GEJA) il rapporto sul registro dei tumori del programma di sorveglianza, epidemiologia e risultati finali (SEER) negli Stati Uniti (dal 1973 al 2008) ha rivelato un aumento di circa 2,5 volte dell'incidenza di questo tumore dal 1973 al 1992, con una prevalenza complessiva di circa 3,1 casi per 100.000 abitanti (Siegel et al., 2015).

Questo aumento è attribuibile principalmente all'aumento dell'incidenza dell'esofago di Barrett (nei pazienti con GERD di lunga data), che costituisce il principale fattore di rischio per lo sviluppo dell'adenocarcinoma dell'esofago e della giunzione gastroesofagea (Buas et al., 2015).

L'età media d'insorgenza di queste due neoplasie è intorno ai 65 anni.

Interessano più frequentemente soggetti di sesso maschile, razza caucasica e classe sociale elevata (Patel & Benipal, 2018).



Numerosi studi hanno riportato aumenti simili nell'incidenza di questa neoplasia anche in molte altre regioni del mondo, tra cui: Svezia, Canada, Gran Bretagna e gran parte dell'Europa (Kamangar et al., 2006).



In Italia, stime recenti dei Registri Tumori indicano un'incidenza di 2.025 nuovi casi di adenocarcinoma esofageo/anno nel sesso maschile e di 548 nuovi casi/anno nel sesso femminile, con tassi più elevati nelle regioni del Nord-Est ed in Lombardia.

La mortalità si attesta intorno a 3-5/100.00 abitanti con un numero di decessi maggiore di 6-7 volte negli uomini rispetto alle donne (AIOM | Associazione Italiana di Oncologia Medica – Official Website, s.d.).

Per quanto riguarda la prognosi degli adenocarcinomi della giunzione esofago-gastrica, il SEER ha mostrato modesti miglioramenti nella sopravvivenza complessiva a 5 anni:

- dal 1973 al 1984, la sopravvivenza a 5 anni è stata dell'8%
- dal 1985 al 1986, del 12%
- dal 1997 al 2008, del 17% (per l'adenocarcinoma GEJ di qualsiasi stadio) (Lightdale, 2003).

L'immagine sottostante riporta l'HR aggiustato per (Siegel et al., 2015):

- mortalità complessiva dell'adenocarcinoma della giunzione gastroesofagea (A)
- stadio per anno di diagnosi (1973-1984, 1985-1996, 1997-2008) (B)
- etnia (C)

A.

Stage	Hazard Ratio (#)	95% CI	
Localized	1.00		
Regional	1.71	1.62	1.81
Distant	3.99	3.75	4.24

B.

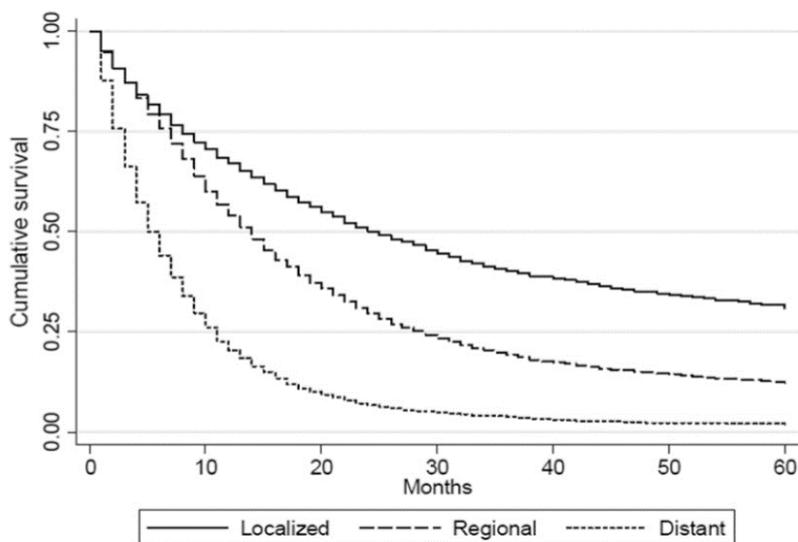
Year of diagnosis	Hazard Ratio (#)	95% CI	
1973-1984	1.00		
1985-1996	0.86	0.82	0.91
1997-2008	0.73	0.70	0.77

C.

Race	Hazard Ratio (#)	95% CI	
White	1.00		
Black	1.21	1.09	1.34

Data from the National Cancer Institute's SEER Program (SEER*Stat Database: Incidence: SEER 9 Regs Public Use, November 2010 submission).

Per la malattia locoregionale allo stadio iniziale, il tasso di sopravvivenza a 5 anni è del 25-30% (AIOM | Associazione Italiana di Oncologia Medica – Official Website, s.d.).



C. FATTORI DI RISCHIO

1. Malattia da reflusso gastroesofageo (GERD)

La malattia da reflusso gastroesofageo (Gastro-Esofageal Reflux Disease, GERD) è un disturbo digestivo molto comune in tutto il mondo, con una prevalenza stimata del 18,1-27,8% in Nord America (El-Serag et al., 2014).

Secondo la definizione di Montreal, la GERD rappresenta uno spettro di condizioni consequenziali al reflusso patologico di materiale contenuto nello stomaco in esofago (Vakil et al., 2006).

È la causa più frequente di esofagite (90-95%) e nello specifico coinvolge prevalentemente l'esofago distale.

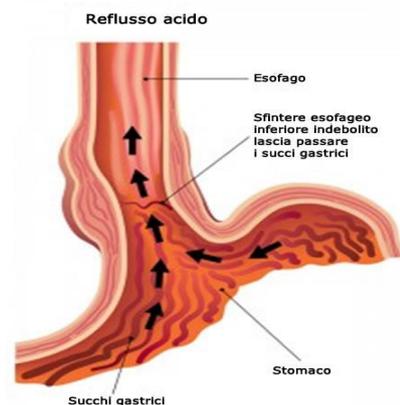
Il reflusso gastroesofageo è un fenomeno fisiologico innescato dalla distensione del fondo gastrico e da rilasciamenti transitori (di 20-30 sec) e inappropriati (non correlati alla deglutizione) del LES (Herregods et al., 2015).

Questo causa il riversamento del contenuto gastrico in esofago, ma normalmente i meccanismi di clearance esofagea consentono di ridurre al minimo il tempo di contatto tra il materiale acido e le mucose, così da evitare l'insorgenza di danni (Green et al., 2000). Il reflusso diventa patologico quando si verifica un aumento in frequenza e durata dei rilasciamenti del

LES, tanto da rendere inefficaci i meccanismi protettivi di clearance esofagea. Il danno della mucosa che si viene a creare è mediato da: acido cloridrico, pepsina, ma anche bile ed enzimi pancreatici, in caso di reflusso pancreatico-digiunale.

La GERD è favorita dallo squilibrio che si crea tra fattori (Ferriolli et al., 1998):

- "aggressivi" che aumentano il quantitativo di materiale che refluisce dallo stomaco in esofago, come :
 - ~ l'aumento di volume ed il conseguente ristagno del contenuto gastrico
 - ~ l'aumento della pressione a livello addominale (stipsi, obesità, ...)



- ~ l'alterata funzionalità del LES a seguito di fattori dietetici (cioccolato, menta, ...) farmacologici (Ca²-antagonisti, nitrati, benzodiazepine, ...) o neuro-ormonali
- ~ l'ernia iatale (fattore permissivo), per il disaccoppiamento tra LES e i pilastri crurali del diaframma
- difensivi, come:
 - ~ alterazione della clearance esofagea per difetto di: peristalsi esofagea, azione tamponante della saliva
 - ~ alterazione dei fattori di resistenza tissutale (barriera mucosale esofagea), come: spessore dello strato epiteliale, giunzioni intercellulari, film mucoso ricco di bicarbonati

Dal punto di vista clinico si manifesta con:

- sintomi tipici, rappresentati da:
 - ~ pirosi retro-sternale ("heartburn"), descritta come un bruciore intenso e fastidioso in sede retrosternale con possibile irradiazione al collo e alla gola
 - ~ rigurgito, ossia emissione di cibo proveniente dall'esofago o dallo stomaco senza nausea o contrazioni addominali forzate
- sintomi atipici, a loro volta distinti in:
 - ~ sintomi comprovati: tosse secca e stizzosa (Chang et al., 2019), laringite, asma, erosioni dentali
 - ~ sintomi proposti: sinusite, faringite, otiti medie ricorrenti, fibrosi polmonare

La malattia da reflusso gastroesofageo ha differenti modelli di presentazione, ovvero:

- malattia erosiva (ERD) in circa il 35% dei casi: si presenta con la clinica canonica della GERD (sintomi tipici e atipici) e con erosioni endoscopicamente evidenti. Secondo la classificazione di Los Angeles (Lundell et al., 1999) possiamo distinguere, in base al n° e alla confluenza delle lesioni, 4 gradi di malattia:
 - ~ grado A: 1 o più erosioni di dimensioni < 5mm di lunghezza che non si estendono per più di 2 pliche contigue

- ~ grado B: 1 o più erosioni di dimensioni > 5mm di lunghezza, che non si estendono per più di 2 pliche contigue
- ~ grado C: 1 o più erosioni che si estendono tra gli apici di 2 pliche contigue, ma che interessano meno del 75% della circonferenza dell'esofago
- ~ grado D: 1 o più erosioni che interessano più del 75% della circonferenza dell'esofago



- malattia non erosiva (NERD) nel 60% dei casi: è la condizione di presentazione più frequente e si manifesta coi sintomi della GERD (tipici e atipici), ma con endoscopia negativa e pH-manometria positiva nel 55% (Savarino et al., 2013)
- esofago ipersensibile (FH), che è la rappresentazione meno frequente e si manifesta con sintomatologia della GERD non correlata all'episodio di reflusso. L'endoscopia e la pH-manometria sono negative e non si ottiene risposta alla terapia con PPI
- complicanze della GERD nel 5% dei casi: esofago di Barrett, adenocarcinoma e stenosi peptica

La diagnosi di GERD si basa sulla clinica e sulla risposta alla terapia empirica con PPI. Quando non si ottiene risposta a tale terapia si consiglia l'esecuzione di un'esofagogastroduodenoscopia, sia per valutare l'effettiva presenza di un'esofagite macroscopica erosiva e le sue possibili complicanze, sia per eseguire dei prelievi biotipici. Nello specifico la diagnosi endoscopica di GERD si pone se si riscontrano:

esofagite di alto grado (LA di grado C o D), esofago di Barrett o stenosi peptica (Richter, 2000).

La figura a lato riporta l'immagine endoscopica di un esofago di Barrett di grado D, secondo la classificazione di Los Angeles.



Il problema è che l'esofagite di alto grado si riscontra solo nel 30% dei pazienti con sintomatologia tipica e non ancora trattati coi PPI, e solo in meno del 10% dei pazienti sotto trattamento. Quindi, nella maggior parte dei casi, l'esofagite è microscopica, o se macroscopica è di basso grado, e quindi non specifica per fare diagnosi di GERD (Richter, 2000).

Per tali motivi, in caso di ulteriori dubbi si consiglia di proseguire il work up diagnostico (Jobe et al., 2013) col monitoraggio ambulatoriale del pH (Roman et al., 2017).

La pH-metria nelle 24h è considerata il gold standard nel diagnosticare in maniera oggettiva gli episodi di reflusso acido e la loro correlazione coi sintomi.

Nello specifico essa definisce un reflusso acido quando il pH è inferiore a 4 e patologico se l'esposizione supera il 5% del tempo di registrazione e la % di corrispondenza tra i sintomi e il reflusso è superiore al 50%.

La resa diagnostica di questo test può essere ulteriormente migliorata con l'aggiunta della pH-impedenzometria (Pritchett et al., 2009), che consente di valutare le proprietà elettriche del contenuto esofageo, così da poter anche rilevare episodi di reflusso non acido, che passerebbero altrimenti inosservati (Lin et al., 1991) .

I soggetti con sintomi da reflusso ricorrenti hanno un rischio maggiore di sviluppare un adenocarcinoma dell'esofago e della giunzione esofago-gastrica (OR=7.7), soprattutto se i sintomi sono severi e di lunga data (OR=43.5).

2. *Obesità*

L'associazione tra l'obesità (specie quella addominale) e il rischio di sviluppare un adenocarcinoma esofageo e della giunzione esofago-gastrica è stata valutata in diversi studi epidemiologici e risulta simile in entrambi i sessi (*AIOM | Associazione Italiana di Oncologia Medica – Official Website, s.d.*).

Presumibilmente tale associazione è dovuta al fatto che l'obesità è uno dei fattori che entra in gioco nello sviluppo della malattia da reflusso gastroesofageo che, a sua volta, predispone alla possibile insorgenza dell'esofago di Barrett, principale fattore di rischio per lo sviluppo di un adenocarcinoma dell'esofago e della giunzione gastroesofagea.

3. *Esofago di Barrett*

L'esofago di Barrett è una complicanza della GERD cronica e si caratterizza per la presenza di metaplasia intestinale nel contesto della mucosa squamosa esofagea.

La sua incidenza è in aumento e si stima che si verifichi nel 10% dei soggetti affetti da GERD sintomatica (Shaheen et al., 2016).

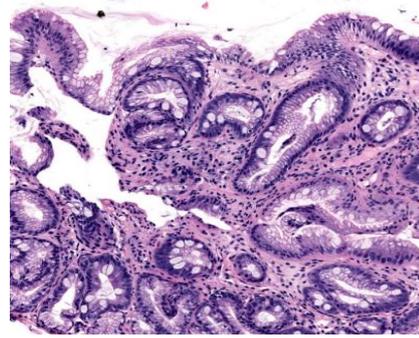
Interessa soprattutto i soggetti di sesso maschile, di razza caucasica, con età compresa tra i 40 e i 60 anni.

La sua importanza risiede nel fatto che è il precursore dell'adenocarcinoma esofageo e della giunzione esofago-gastrica (Sharma et al., 2006).

All'endoscopia le aree di metaplasia si presentano come una o più lingue (chiazze) di mucosa vellutata, color rosa salmone, che si estendono al di sopra della giunzione esofago-gastrica. Queste aree si alternano con una residua mucosa squamosa esofagea, liscia e pallida, e si interfacciano, a livello distale, con una mucosa cilindrica, gastrica di color marrone.



A livello microscopico si deve riscontrare la presenza di cellule calciformi mucipare, caratteristiche dell'epitelio intestinale, che dimostrano la presenza di metaplasia intestinale. È importante l'esclusione di metaplasia intestinale del cardias.



Il termine ESEM (Sospetto Endoscopico di Metaplasia in Esofago) si riferisce ad alterazioni endoscopiche suggestive per un esofago di Barrett che attendono una conferma istologica.

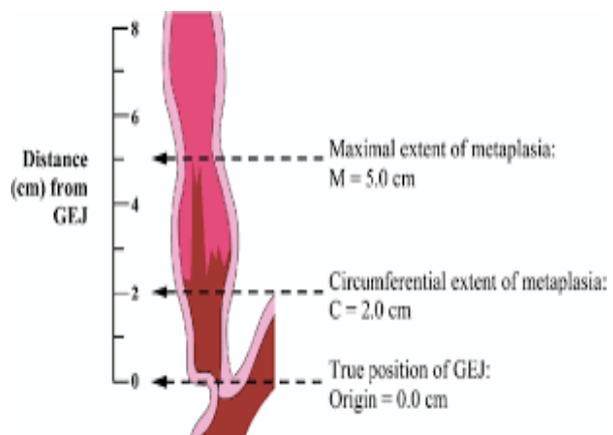
L'esatta definizione della sede delle biopsie e del quadro endoscopico è cruciale per diagnosticare un esofago di Barrett.

Per caratterizzare un ESEM occorrono infatti biopsie multiple e ravvicinate sull'area sospetta: sia la displasia che l'adenocarcinoma, insorti nel contesto di un Barrett, si presentano con lesioni focali che devono essere ricercare molto attentamente.

I prelievi biotici vengono eseguiti con pinza "jumbo" sui 4 quadranti mucosali, ogni 2 cm, partendo dalla giunzione GE e procedendo lungo tutta la lunghezza del Barrett (Naini et al., 2016) (Shaheen et al., 2016).

La descrizione di un ESEM dovrebbe prevedere criteri standardizzati per la misura della sua estensione, che risulta essere direttamente correlata al rischio di sviluppare un adenocarcinoma.

Per tale classificazione vengono utilizzati i criteri di Praga, che si basano sulla misurazione della circonferenza e dell'estensione massima dalla giunzione esofago-gastrica del Barrett (Sharma et al., 2006).



Gli endoscopi a elevata risoluzione hanno permesso di classificare l'esofago di Barrett, in base all'estensione delle aree di metaplasia intestinale, in:

- un Long Barrett: aree di epitelio colonnare con estensione superiore 3 cm dalla giunzione GE
- un Short Barrett: aree di epitelio colonnare con estensione inferiore a 3 cm dalla giunzione GE
- un Ultra-short Barrett o Barrett giunzionale: aree di epitelio colonnare confinate entro 1 cm dalla giunzione GE

Il rischio di trasformazione neoplastica è di circa 30 volte maggiore se il Barrett è più lungo di 2 cm. Al contrario, se è inferiore a 2 cm o se contiene solo metaplasia di tipo intestinale, il rischio risulta essere minore (Hvid-Jensen et al., 2011).

4. *Displasia in esofago*

Col termine displasia si indica l'inequivocabile proliferazione epiteliale pre-neoplastica, caratterizzata da disordine citologico ed architetturale, priva di carattere invasivo (Neoplasia Non Invasiva, NiN).

La displasia viene definita di:

- basso grado, quando presenta:
 - ~ una maturazione superficiale scarsa
 - ~ un'architettura lievemente distorta
 - ~ ghiandole affollate
- alto grado, quando presenta:
 - ~ maturazione superficiale totalmente assente
 - ~ architettura evidentemente distorta
 - ~ affollamento di ghiandole, focali gemmazioni, ghiandole cribriformi e ramificate
 - ~ modificazioni citologiche gravi (nuclei grandi in superficie, pleomorfismo nucleare e perdita di polarità), mitosi atipiche, mucina scarsa o assente, infiammazione minima/assente

Il campione biopsiato può essere (Schimdt, 1985):

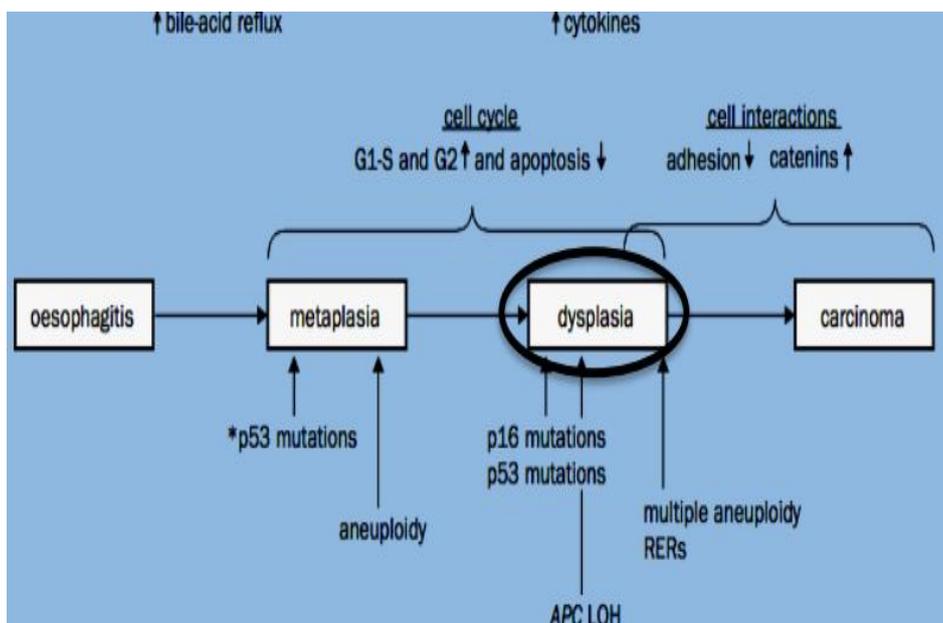
- negativo per displasia
- indefinito per displasia
- positivo per displasia (basso/alto grado)

In generale, il problema nella diagnosi di displasia è che mentre la metaplasia riguarda una grande porzione dell'esofago, per cui la biopsia può essere fatta indifferentemente in qualsiasi punto di mucosa interessata, la displasia invece può essere estremamente localizzata, per cui ripetendo la biopsia possono uscire risultati diversi.

La storia naturale di un adenocarcinoma insorto su esofago di Barrett prevede quindi il passaggio da metaplasia a displasia, prima a basso grado e poi ad alto grado. Infine, da displasia ad alto grado a adenocarcinoma invasivo.

La displasia di alto grado e l'adenocarcinoma insorti in segmenti lunghi o brevi di esofago di Barrett sembrano derivare da alterazioni genetiche simili, quali:

- cambiamenti nella ploidia del DNA
- alterazioni del gene p53 e MAPK
- proliferazione abnorme ed aumentata (\uparrow COX-2 \rightarrow \uparrow PGE2 \rightarrow \uparrow proliferazione)



Tuttavia poiché non si tratta di marcatori certi, la diagnosi di certezza dell'adenocarcinoma si basa ancora esclusivamente sull'analisi microscopica.

I pazienti con displasia di alto grado presentano un rischio del 15-50% di trasformazione in adenocarcinoma invasivo (Rastogi et al., 2008), con un tasso di incidenza annuale del 7% (Hvid-Jensen et al., 2011).

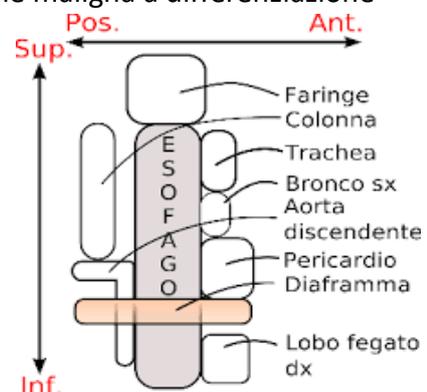
La displasia di basso grado può evolvere in displasia di alto grado o carcinoma durante un periodo anche maggiore di 10 anni.

Pertanto, la migliore speranza di sopravvivenza nell'adenocarcinoma esofageo rimane lo screening endoscopico e la sorveglianza dei pazienti con esofago di Barrett per rilevare la displasia e l'adenocarcinoma in fase iniziale di malattia, quando ancora sono possibili interventi potenzialmente curabili (Shaheen et al., 2016).

D. INQUADRAMENTO DIAGNOSTICO

1. INQUADRAMENTO DIAGNOSTICO NELL'ADENOCARCINOMA DELL'ESOFAGO

L'adenocarcinoma dell'esofago è una neoplasia epiteliale maligna a differenziazione ghiandolare, che insorge prevalentemente nel contesto di aree di metaplasia intestinale di Barrett, consequenzialmente alla presenza di una malattia da reflusso gastroesofageo di lunga data (GERD). Per tale motivo insorge prevalentemente a livello dell'esofago distale.



Le forme iniziali sono poco evidenti e talora multifocali, mentre le forme avanzate sono prevalentemente ulcerate. In 1/3 dei casi invece si tratta di forme polipoidi vegetanti.

La diagnosi di certezza si effettua mediante un'esofago-gastro-duodenoscopia con biopsia e brushing citologico (accuratezza > 90%).

Microscopicamente generalmente sono forme bene o moderatamente differenziate, con struttura ghiandolare tubulare o papillare, di tipo intestinale.

La lesione è spesso circondata da aree di metaplasia intestinale.

Può infiltrare la parete esofagea e nel tempo estendersi oltre la tonaca avventizia e dare possibili metastasi loco-regionali e a distanza.

Si eseguono poi una TC torace/addome e la PET per la stadiazione.

La stadiazione di riferimento è quella proposta e assegnata di recente dall'American Joint Committee on Cancer (AJCC) secondo Classificazione TNM 8° Ed. e differenzia i tumori dell'esofago per istotipo, localizzazione e grado di differenziazione (Jiang et al., 2020).

Tumore primitivo (T)

- TX** la presenza di tumore primitivo non può essere accertata
- T0** non evidenza di tumore primitivo
- Tis** carcinoma in situ/displasia di alto grado (HGD)
- T1** il tumore invade la mucosa o la lamina propria o la muscolaris mucosae o la sottomucosa
- T1a** il tumore invade la mucosa o la lamina propria o la muscolaris mucosae
- T1b** il tumore invade la sottomucosa
- T2** il tumore invade la muscolaris propria
- T3** il tumore invade l'avventizia
- T4** il tumore invade le strutture adiacenti
- T4a** il tumore invade la pleura, il pericardio, la vena azygos, il diaframma o il peritoneo
- T4b** il tumore invade altre strutture adiacenti come l'aorta, i corpi vertebrali o le vie aeree (bronchi, trachea)

Linfonodi regionali (N)

I linfonodi regionali, indipendentemente dalla sede del tumore primitivo, sono quelli inclusi nell'area di drenaggio linfatico dell'esofago comprendente i linfonodi dell'asse celiaco e i linfonodi paraesofagei del collo, ma non i linfonodi sovra clavicolari.

- NX** la presenza di metastasi ai linfonodi regionali non può essere accertata
- N0** non evidenza di metastasi ai linfonodi regionali
- N1** metastasi in 1 o 2 linfonodi regionali
- N2** metastasi in 3-6 linfonodi regionali
- N3** metastasi in ≥ 7 linfonodi regionali

Metastasi a distanza (M)

- Mx** la presenza di metastasi a distanza non può essere accertata
- M0** non evidenza di metastasi a distanza
- M1** metastasi a distanza

Grado istologico

- Gx** il grado tumorale non può essere accertato
- G1** tumore ben differenziato
- G2** tumore moderatamente differenziato
- G3** tumore scarsamente differenziato, indifferenziato

Adenocarcinoma, Stadio Clinico (cTNM)

Stadio	cT	cN	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
IIA	T1	N1	M0
IIB	T2	N0	M0
III	T2	N1	M0
	T3	N0-1	
	T4a	N0-1	
IVA	T1-4a	N2	M0
	T4b	N0-2	
	ogni T	N3	
IVB	ogni T	ogni N	M1

Adenocarcinoma, Stadio Patologico (pTNM)

Stadio	pT	pN	M	Grado
0	Tis (HGD)	N0	M0	
IA	T1a	N0	M0	G1, GX
IB	T1a	N0	M0	G2
	T1b			G1-2, GX
IC	T1	N0	M0	G3
	T2			G1-2
IIA	T2	N0	M0	G3, GX
IIB	T1	N1	M0	ogni G
	T3	N0		GX
IIIA	T1	N2	M0	ogni G
	T2	N1		
IIIB	T2	N2	M0	ogni G
	T3	N1-2		
	T4a	N0-1		
IVA	T4a	N2	M0	ogni G
	T4b	N0-2		
	ogni T	N3		
IVB	ogni T	ogni N	M1	ogni G

Adenocarcinoma, Stadio post-Neoadiuvante (ypTNM)

Stadio	ypT	ypN	M
I	T0	N0	M0
II	T3	N0	M0
IIIA	T0-2	N1	M0
IIIB	T3	N1	M0
	T0-3 T4a	N2 N0	
IVA	T4a	N1-2, NX	M0
	T4b	N0-2	
	ogni T	N3	
IVB	ogni T	ogni N	M1

2. INQUADRAMENTO DIAGNOSTICO NEGLI ADENOCARCINOMI DELLA GIUNZIONE ESOFAGO-GASTRICA

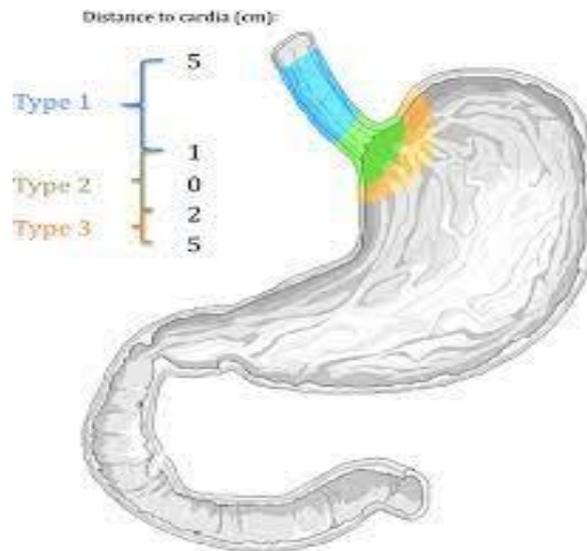
L'inquadramento clinico-patologico degli adenocarcinomi della giunzione gastro-esofagea è tuttora ampiamente dibattuto. Alcuni autori ritengono che questi tumori debbano essere inquadrati e trattati come i tumori dell'esofago (Rice et al., 2010), altri, li considerano, in quanto adenocarcinomi, più simili ai tumori dello stomaco (Rice et al., 2017) .

Altri ancora sostengono che, per la loro variabilità nelle manifestazioni cliniche e per la loro evoluzione, debbano essere considerati un'entità autonoma (Liu et al., 2019).

Proprio per cercare di fare chiarezza sulla sede di origine di questi tumori, Siewert e coll. nel 1987 hanno proposto una classificazione anatomotopografica sulla base della distanza del loro centro dal cardias anatomico (Siewert et al., 1987). Questa classificazione morfologica, ottenuta attraverso lo studio radiologico, endoscopico e anatomopatologico del pezzo operatorio, individua 3 tipi di tumore (Siewert & Stein, 1998) (Siewert et al., 2005):

- tumori di Siewert di tipo I, in cui il centro della neoplasia si colloca tra 1 cm prossimalmente e 5 cm distalmente rispetto al cardias (adenocarcinoma dell'esofago distale)

- tumori di Siewert di tipo II, il cui centro è localizzato tra 1 cm prossimalmente e 2 cm distalmente rispetto al cardias (carcinoma vero del cardias)
- tumori di Siewert di tipo III, in cui la parte centrale è localizzata tra 2 e 5 cm distalmente rispetto al cardias (carcinoma gastrico sottocardiale)



L'obiettivo principale delle procedure diagnostiche per gli adenocarcinomi della giunzione gastroesofagea, è quello di distinguere i pazienti candidati a trattamenti radicali da quelli metastatici. Per farlo occorre eseguire:

- una valutazione complessiva del pazienti (comorbidità, stato nutrizionale, ...)
- un'esofagogastroduodenoscopia (EGDS) con prelievi biotici
- TC con mdc

In caso di assenza di secondarismi si procede con:

- PET-TC/EUS
- classificazione secondo Siewert/8° edizione del TNM (Jiang et al., 2020)
- laparoscopia esplorativa e citologia peritoneale in caso di neoplasia localmente avanzata (T3 o N+)

La classificazione di Siewert viene tuttora considerata fondamentale per standardizzare la diagnosi ed il trattamento del tumore della giunzione gastroesofagea e da molti

autori viene considerata prognosticamente migliore rispetto al TNM (Curtis et al., 2014).

La recente revisione del TNM 8^a edizione ha ripreso la classificazione di Siewert considerando le neoplasie Siewert I e Siewert II nel gruppo dei tumori esofagei e inserendo il gruppo delle neoplasie Siewert 3 nella categoria delle neoplasie dello stomaco.

E. CLASSIFICAZIONE MOLECOLARE

Per quanto concerne l'adenocarcinoma esofageo, la descrizione delle alterazioni molecolari in letteratura è abbondante.

Un recente lavoro di Pinto et al. (Pinto et al., 2022) ha dimostrato che le principali modificazioni genetiche sono rappresentate da:

- TP53: il soppressore tumorale TP53 è di gran lunga il gene mutato più frequentemente in questi tumori, con frequenze riportate dal 7 all'83%
- metilazione di CDKN2A: risulta essere frequente sia nell'esofago di Barrett che nell'adenocarcinoma, rimarcando l'importanza della sequenza metaplasia → displasia → adenocarcinoma
- instabilità dei microsatelliti

Contrariamente ad altri tumori gastrointestinali, l'ipermetilazione del promotore MLH1 è rara nell'adenocarcinoma esofageo.

Inoltre le amplificazioni contenenti VEGFA, HERB2, GATA6 e CCNE1 e la delezione di SMAD4 si sono mostrate particolarmente frequenti.

In particolare, la sovra-espressione o l'amplificazione del gene o della proteina HER2 è stata implicata nello sviluppo sia degli adenocarcinomi esofagei che della giunzione.

Per quanto riguarda i carcinomi della giunzione esofago-gastrica, nel 2014 The Cancer Genome Atlas (TCGA) ha individuato quattro sottotipi molecolari generalmente presenti:

- sottotipo EBV (Yanai et al., 1997): i tumori della giunzione associati a virus di Epstein-Barr si verificano principalmente nello stomaco prossimale (fondo e corpo) in pazienti che possono essere relativamente giovani (età media alla diagnosi 58-60 anni) e di sesso maschile, e in genere hanno un'istologia scarsamente differenziata, con alti livelli di infiltrazione di cellule immunitarie ed espressione dei ligandi di morte programmata 1 e 2 (PD-L1 e PD-L2) (van Beek et al., 2004).

- sottotipo con instabilità dei micro-satelliti, MSI: è un fenotipo molecolare derivante da una ridotta funzione di riparazione del mismatch del DNA (MMR) a causa della metilazione del promotore MLH1 o di mutazioni nei geni correlati all'MMR (Murphy et al., 2006).

Circa il 15% dei tumori MSI-H della giunzione è associato alla sindrome di Lynch, una sindrome ereditaria di predisposizione al cancro causata da mutazioni germinali nei geni MMR.

Questi tumori presentano tipicamente una densa infiltrazione linfocitaria e un'espressione diffusa di proteine del checkpoint immunitario, come PD-L1, evidenziando l'immunogenicità generalmente elevata di questo sottotipo (Bartley et al., 2022).

- sottotipo con instabilità cromosomica (CIN): i tumori della giunzione con marcata aneuploidia, determinata da un'ampia perdita di materiale genetico a livello cromosomico e/o a livello del braccio, sono stati classificati come CIN (Oki et al., 1999). Questo sottotipo è il più frequente (50%).

Le caratteristiche principali includono l'arricchimento con mutazioni TP53 e le amplificazioni ricorrenti di geni che codificano per recettori tirosin-chinasici, KRAS o NRAS o per mediatori del ciclo cellulare e VEGFA, alcuni dei quali sono potenzialmente bersagliabili

- sottotipo genomicamente stabile (GS): i tumori della giunzione privi di caratteristiche associate a uno qualsiasi degli altri sottotipi sono stati classificati come GS (Oki et al., 1999).

Questo tipo di tumore è solitamente del sottotipo istologico diffuso e tende a insorgere in età più giovane (mediana 59 anni alla diagnosi). Le caratteristiche molecolari più importanti includono mutazioni che si escludono a vicenda e sono associate alla transizione epitelio-mesenchimale (EMT).

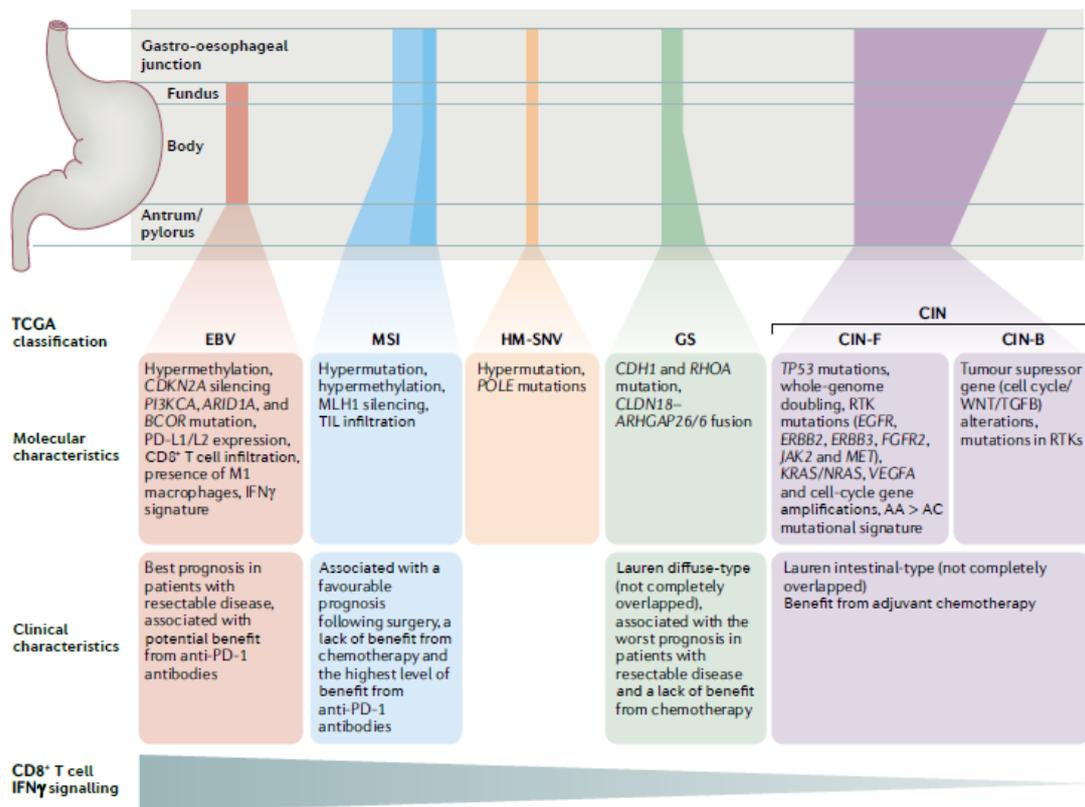


Fig. 1 | Molecular and clinical characteristics of TCGA subtypes of G/GEJ cancer by anatomical distribution. Coloured shapes represent the anatomical distribution and relative incidence of The Cancer Genome Atlas (TCGA) subtypes across the stomach; the table lists the distinct molecular and clinical characteristics of the four subtypes. The incidence of MSI-H subtype is lower in metastatic disease (dark blue) than in all stages (light blue). CIN, chromosomal instability; CIN-B, CIN-broad; CIN-F, CIN-focal; EBV, Epstein-Barr virus; G/GEJ, gastric or gastro-oesophageal junction; GS, genomically stable; HM-SNV, hypermutated single nucleotide variant; MSI, microsatellite instability; RTK, receptor tyrosine kinase; TIL, tumour-infiltrating lymphocyte.

Tale studio ha anche evidenziato un piccolo sottogruppo di tumori ipermutati non MSI-H come ipermutati con varianti prevalentemente a singolo nucleotide (SNV).

Attualmente, i test molecolari per lo stato HER2, lo stato di instabilità dei microsatelliti e l'espressione del ligando di morte programmata 1 (PD-L1) sono utilizzati nella gestione clinica dei tumori esofagei e della giunzione localmente avanzati, non resecabili e metastatici.

F. FATTORI PROGNOSTICI

I principali fattori prognostici sono rappresentati da:

- stadio
- profilo molecolare
- istotipo
- invasione vascolare
- invasione perineurale

Fino ad ora le scelte terapeutiche sono state orientate soprattutto facendo riferimento allo stadio e al profilo molecolare.

Le neoplasie della giunzione esofago-gastrica sono caratterizzate da elevata aggressività biologica, con precoce interessamento linfonodale locoregionale (LN paraesofagei, della piccola curvatura gastrica e celiaci).

Nel 20-25 % degli stadi localmente avanzati (T3 o N+) è presente carcinosi peritoneale occulta.

La OS a 5 anni è:

- stadio I del 90%
- stadio II del 50-60%
- stadio III del 10-15%

2) RUOLO DEGLI ISTOTIPI NELLA PROGnosi

Finora lo stadio e il profilo molecolare/profilo molecolare surrogato sono stati considerati come i fattori prognostici di gran lunga più importanti, mentre è sempre stato sottovalutato il ruolo della sottotipizzazione istologica.

Nel 2021 è stato pubblicato uno studio, a cui ha contribuito l'Unità di Anatomia Patologica del Policlinico San Martino di Genova, sull'impatto prognostico dell'istologia nell'adenocarcinoma dell'esofago e della giunzione gastro-esofagea (Fiocca et al., 2021).

Questo lavoro si è basato su una casistica di 299 adenocarcinomi dell'esofago e della giunzione esofago-gastrica, sottoposti ad intervento chirurgico senza terapia neoadiuvante, raccolti da 7 centri dal 1998 al 2016.

Gli adenocarcinomi sono stati distinti nei seguenti macrogruppi:

- 1) adenocarcinomi di tipo ghiandolare
- 2) adenocarcinomi ad istotipo raro

Gli adenocarcinomi di tipo ghiandolare rappresentavano l'80% degli AE/AGEG.

In base al grado di differenziazione sec. WHO 2019 (presenza di una componente solida poco differenziata in più o meno del 6% della neoplasia complessivamente valutata) e all'impatto prognostico dello stesso, gli adenocarcinomi ghiandolari sono stati distinti in:

- a. adenocarcinomi ghiandolari ben differenziati (in cui meno del 6% della neoplasia presentava una architettura solida poco differenziata)
- b. adenocarcinomi ghiandolari poco differenziati (in cui più del 6% della neoplasia presentava una architettura solida poco differenziata)

Gli adenocarcinomi ad istotipo raro costituivano il 20% degli AE/AGEG ed in base alle caratteristiche morfologiche ed al pattern di crescita sono stati distinti in:

- a. adenocarcinomi mucinosi muco-nodulari (MMC)
- b. adenocarcinomi mucinosi invasivi (IMC)
- c. adenocarcinomi diffusi desmoplastici (DDM)
- d. adenocarcinomi diffusi anaplastici (DAC)

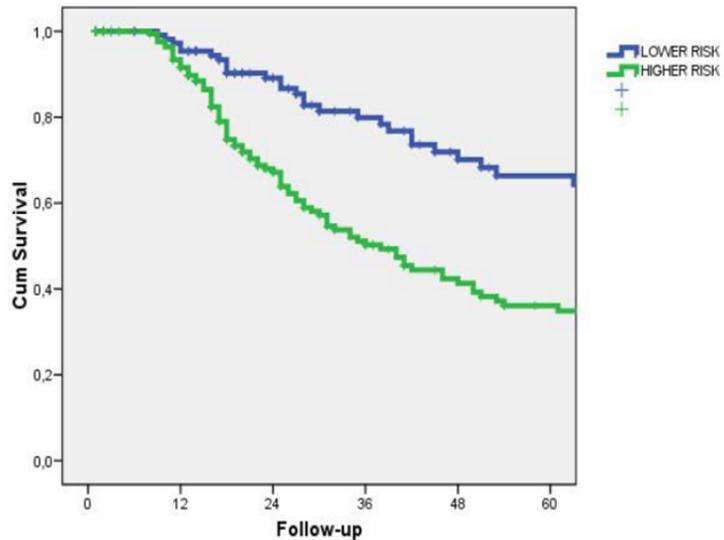
e. adenocarcinomi di tipo misto (MIX), in cui erano presenti sia una componente ghiandolare che una componente a cellule poco coese e diffuse

Grazie alle curve di sopravvivenza è stato possibile distinguere i 7 precedenti istotipi in 2 grossi gruppi:

- ❖ gli adenocarcinomi a basso rischio, che comprendevano:
 - ~ gli adenocarcinomi ghiandolari ben differenziati
 - ~ gli adenocarcinomi mucinosi muconodulari
 - ~ gli adenocarcinomi diffusi desmoplastici
- ❖ gli adenocarcinomi ad alto rischio, che comprendevano:
 - ~ gli adenocarcinomi ghiandolari poco differenziati
 - ~ gli adenocarcinomi mucinosi invasivi
 - ~ gli adenocarcinomi diffusi anaplastici
 - ~ gli adenocarcinomi misti

La CSS a 5 anni dei primi era del 66,3%, mentre quella dei secondi del 36,1%.

**Cancer Specific Survival
<0.0001**



5 years survival

Lower Risk (GL WD + MUC WD + DIFF DESMOPL): 66.3%

Higher Risk (GL PD + DIFF ANAPL + MUC PD + MIX): 36.1% %

Per quanto riguarda l'analisi di sopravvivenza degli adenocarcinomi ghiandolari, hanno avuto un impatto prognosticamente significativo sulla CSS in analisi univariata:

- la percentuale della componente scarsamente differenziata
- il pattern di crescita infiltrativo di Ming
- l'invasione vascolare
- l'invasione perineurale

Gli stessi parametri sono stati valutati in analisi multivariata e quello che è emerso era che la percentuale della componente scarsamente differenziata, che permetteva di distinguere gli adenocarcinomi ghiandolari di basso grado/ben differenziati (GL-WD) rispetto agli adenocarcinomi di alto grado/scarsamente differenziati (GL-PD), era la caratteristica meglio correlata con la sopravvivenza ($p=0,010$). Anche l'invasione vascolare ($p=0,036$) e l'invasione perineurale ($p=0,040$) si sono dimostrate statisticamente significative, ma con un'inferenza statistica inferiore rispetto al parametro precedente.

Per quanto riguarda l'analisi di sopravvivenza degli istotipi rari, utilizzando il test del χ^2 e applicando la correzione di Bonferroni, è stata rilevata una differenza significativa nella frequenza di mortalità tra l'MMC e il DDC, rispetto all'IMC, il DAC e ai carcinomi misti ($p=0,0125$).

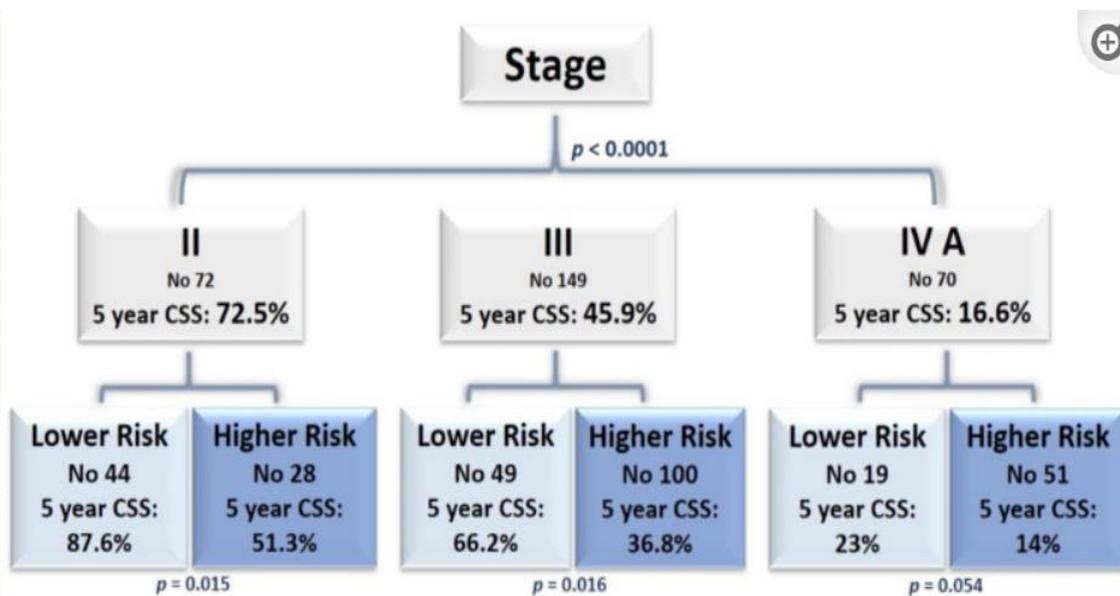
L'analisi univariata di sopravvivenza dell'intera coorte ha evidenziato come statisticamente significativi, in relazione alla CSS, i seguenti parametri:

- l'età, cut off 72 aa
- la presenza di almeno il 5% di cellule ad anello con castone
- la presenza di cellule non coesive
- il pattern di crescita infiltrativo secondo Ming
- la presenza di invasione vascolare
- la presenza di invasione perineurale
- lo stadio
- la classificazione istologica

Valutando gli stessi parametri in analisi multivariata, soltanto 4 hanno mantenuto un significativo impatto prognostico:

- lo stadio
- la classificazione istologica (rischio elevato, rischio basso)
- l'età del paziente
- l'invasione vascolare

Infine, la valutazione combinata dello stadio e dei sottotipi istologici ha dimostrato avere un elevato potere discriminante per la CSS a 5 anni, che va dall'87,6% nel gruppo a rischio più basso in stadio II al 14% nel gruppo a rischio più alto in stadio IVA.



In conclusione, la principale novità di questo studio è stata l'introduzione di un algoritmo diagnostico che distingue gli adenocarcinomi con architettura ghiandolare dagli istotipi rari, e suddivide ulteriormente i primi in base al grado di differenziazione e i secondi in base alla morfologia ed al pattern di crescita.

Questa sottotipizzazione ha dimostrato di avere un impatto prognostico statisticamente significativo specialmente se abbinata allo stadio.

3) OBIETTIVI DELLO STUDIO: TUMOR BUDDING COME FATTORE PROGNOSTICO

Negli adenocarcinomi del grosso intestino il budding ha un importante ruolo prognostico e la sua valutazione ha subito nel corso degli anni un processo di standardizzazione al fine di consentire l'utilizzo di tale parametro in modo oggettivo e riproducibile.

Nella discussione dello studio appena descritto, è stato ipotizzato che il Tumor Budding potesse avere un importante ruolo prognostico anche negli adenocarcinomi esofagei, soprattutto ad istotipo ghiandolare.

Tuttavia questa ulteriore valutazione, fino ad oggi, non è ancora stata fatta.

In letteratura sono presenti pochi lavori, spesso su casistiche limitate, talora senza una caratterizzazione morfologica accurata delle neoplasie e senza utilizzare i criteri di Lugli (Lugli et al., 2017) che vengono di norma applicati nell'adenocarcinoma colon-rettale.

Per tentare di superare questi limiti, per il mio studio mi sono basata su una casistica molto ampia di adenocarcinomi dell'esofago e della giunzione, in cui ho selezionato solo gli istotipi di tipo ghiandolare e su cui ho applicato i criteri dell'ITBCC.

4) TUMOR BUDDING

Il concetto del Tumor Budding (TB) è stato descritto da Imai et al. nel 1954, come uno "sprouting", una germinazione di alcune cellule tumorali, che si verifica sul fronte invasivo dei carcinomi, e che è responsabile di un più rapido tasso di crescita tumorale. Solo negli anni '80 però, la comunità scientifica ha iniziato a prestare attenzione a tale fenomeno, quando Gabbert et al. (Gabbert et al., 1985). lo definirono come "un'evidente dissociazione di complessi organizzati di cellule tumorali in cellule isolate, unitamente alla perdita della maggior parte delle caratteristiche citologiche di differenziazione".

Negli stessi anni, è stato per la prima volta introdotto il termine "budding", in una pubblicazione di Yokoama et al (Yokoyama & Nagayo, 1986), per descrivere un modello di crescita infiltrativo di piccoli focolai di cancerogenesi di early gastric cancer

di tipo intestinale e diffuso/ad anello con castone, simile ad un “germoglio” (Yokoyama & Nagayo, 1986).

L’attuale definizione del Tumor Budding è attribuibile al gruppo di lavoro di Lugli et al. dell’International Tumor Budding Consensus Conference del 2016, che lo descrive come il distacco di singole cellule, o di un cluster di solo 4 cellule, sul fronte invasivo del tumore; dimostrando che il valore prognostico del TB non fosse influenzato dal numero di cellule costituenti il cluster. Questo nuovo cut-off ha inoltre permesso di distinguere il TB da una nuova entità istopatologica, il Poorly Differentiated Cluster, ossia un cluster di almeno 5 cellule.

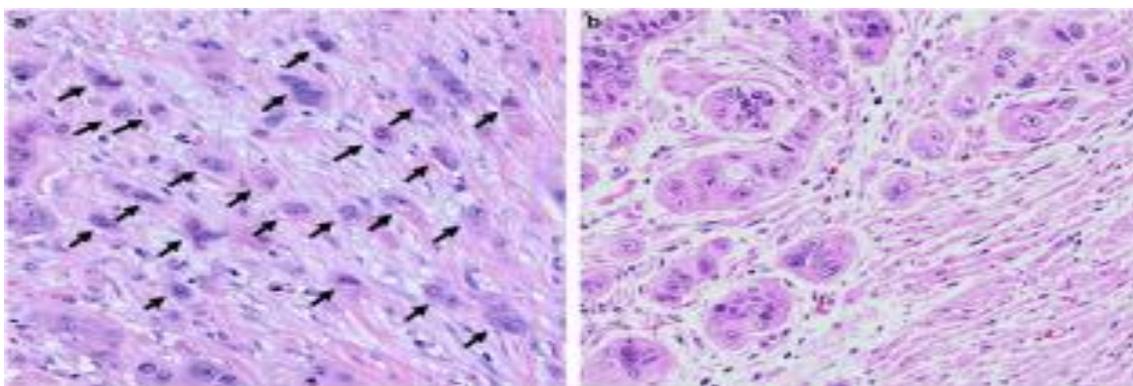


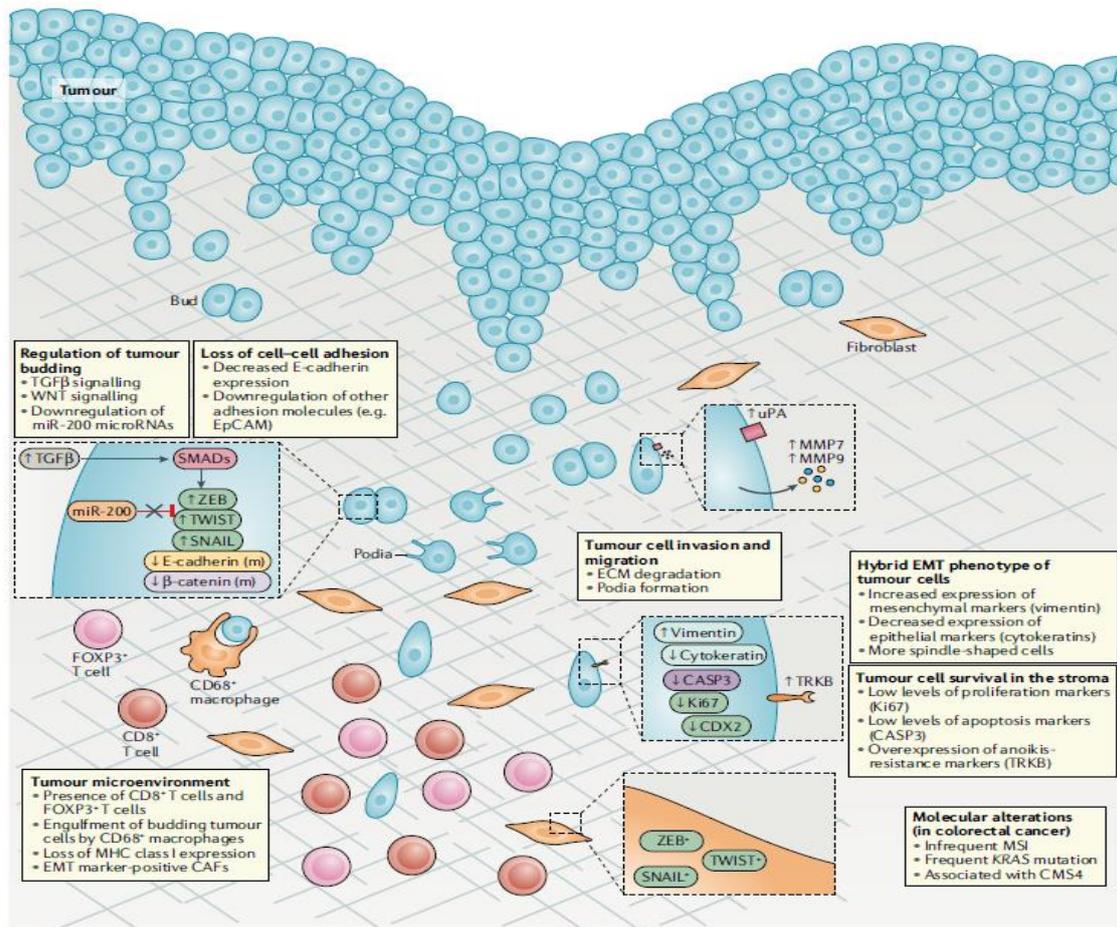
Figure 1: Example of tumor budding (a) that is defined as single tumor cells or tumor cell clusters at up to four cells. Example of poorly differentiated clusters (b) that are defined as five tumor cells or more.

Sebbene il fenomeno del TB sia più prominente sul fronte invasivo, si verifica anche nel contesto del tumore stesso, "TB intratumorale" (ITB), che viene così distinto dal "classico" TB peritumorale (Mitrovic et al., 2012).

Biologicamente il TB appartiene al microambiente tumorale (TME) e, per questo, secondo alcuni autori, va incontro ad una transizione epitelio-mesenchimale (EMT), caratterizzata da una serie di eventi molecolari che consentono alle cellule epiteliali tumorali di acquisire un fenotipo di tipo mesenchimale.

Tali cellule, perdendo le interazioni cellula-cellula e l’adesione intercellulare, abbandonano lo strato epiteliale, superano la membrana basale ed entrano nel tessuto connettivo, dove, non essendo riconosciute come estranee, possono continuare

imperterrite ad invadere i tessuti circostanti, o ad infiltrare i vasi sanguigni o linfatici e metastatizzare anche a distanza (Zlobec & Lugli, 2018).



Il TB, infatti, è frequentemente rinvenuto in neoplasie caratterizzate dall'attivazione costitutiva della via di signaling di WNT, di TGF- β e dei microsatelliti, responsabili della trascrizione di ZEB, TWIST e SNAIL, repressori dell'espressione delle E-caderine e delle β -catetina.

I buds mostrano inoltre enzimi necessari per la migrazione stromale, come metalloproteinasi e catepsine, e resistenza ad apoptosi, chemioterapici e morte cellulare immunogenica grazie alla ridotta espressione di caspasi e proteina RKIP.

Per questi motivi il TB è generalmente associato ad un elevato rischio di interessamento linfonodale, disseminazione metastatica, recidiva locale e a distanza e aggressività biologica (Koelzer et al., 2016).

A. METODI DI VALUTAZIONE DEL TUMOR BUDDING

Negli anni si sono susseguiti numerosi studi per il conteggio del budding tumorale.

Il primo sistema valutativo risale al 1993 da parte del gruppo di lavoro di Hase et al. (Hase et al., 1993a) il quale individuava due categorie, la Bd1, di basso grado, in cui il budding o è assente o lievemente presente, e la Bd2, di alto grado, in cui la presenza del budding è compresa tra moderata e severa. Il limite di questo sistema valutativo è che si basa su un'osservazione di tipo soggettivo, quindi non scevra da scarsa riproducibilità intra ma soprattutto inter-osservatore.

Da allora sono stati condotti numerosi studi tutti applicati al carcinoma del colon-retto.

Tra queste citiamo:

- Ueno et al. nel 2002 (Ueno et al., 2002) hanno proposto un sistema di valutazione quantitativo sui CCR in fase avanzata, basato sul conteggio dei buds in un'area di 0.385 mm^2 (x25) e sulla base ad un cut off di 10 buds hanno distinto 2 categorie:
 - ~ basso grado <10 buds
 - ~ alto grado ≥ 10
- Ueno et al. (Ueno et al., 2004) nel 2004 lo stesso gruppo di lavoro ha applicato lo stesso sistema di valutazione quantitativo ma sui CCR precoci, in un'area di 0.785 mm^2 e con un cut off stabilito di 5 buds.
- nel 2005 Nakamura et al (Nakamura et al., 2005). hanno ripreso e migliorato la suddivisione in due categorie dei 4 pattern descritti in precedenza da Hase (Hase et al., 1993b), proponendo un metodo semi-quantitativo applicabile solo sui CCR in fase avanzata:
 - ~ il pattern lieve identificava un fronte invasivo interessato per meno di $1/3$ dal TB,
 - ~ il pattern moderato fra $1/3$ e $2/3$
 - ~ il pattern severo per più di $2/3$ (Nakamura et al., 2008).
- nel 2009 Wang et al (Wang et al., 2009). hanno proposto due nuovi metodi per valutare il TB nei CCR di secondo stadio: il primo, più convenzionale, prevedeva la scansione dei vetrini a basso ingrandimento (x40) per identificare l'area con la

maggior densità di buds, sulla quale poi veniva effettuato il conteggio ad alto ingrandimento (x200, su un'area di 0,985 mm²). Nei casi in cui non si riusciva ad identificare l'area a basso ingrandimento il conteggio veniva effettuato su cinque aree casualmente selezionate e si riportava la mediana del conteggio.

Il secondo metodo, più rapido, consisteva nello scansionare da subito i vetrini ad alto ingrandimento e, anziché effettuare un conteggio, si considerava semplicemente se l'area ispezionata fosse positiva (≥ 1 bud) o negativa per TB. Se il bud era presente in più del 50% delle aree osservate si definiva di alto grado, in caso contrario veniva definito di basso grado.

- Karamitopoulou et al. (Karamitopoulou et al., 2013) nel 2013 hanno proposto il sistema dei 10 HPF che, a differenza dei precedenti metodi, prevedeva una colorazione per pan-citocheratina con anticorpi AE1/AE3.

I vetrini venivano inizialmente scansionati ad ingrandimento panoramico (x5), per selezionare quello con la maggiore densità di TB peri-tumorale. Su questo vetrino veniva poi effettuato il conteggio, ad un più alto ingrandimento (x40), su 10 aree selezionate casualmente ed in base ad un cut off stabilito di 10 buds si identificavano due categorie:

- ~ basso grado < 10 buds
- ~ alto grado ≥ 10 buds

Il sistema ritenuto, ad oggi, lo standard per la valutazione del TB è il metodo dell'hotspot, come raccomandato da Lugli et al. in seguito all'International Tumor Budding Consensus Conference del 2016.

Tale sistema prevede, prima della scansione dei vetrini (colorati con H&E), di definire il diametro del campo di osservazione espresso in mm² e non sulla base della lente di ingrandimento (es. x20), visto che basandosi su quest'ultimo aspetto il campo visivo può variare da microscopio a microscopio.

L'area standard utilizzata dall'ITBCC è di 0.785 mm², che corrisponde all'area utilizzata da Ueno et al. e dalla società giapponese per il cancro del colon-retto.

Per permettere una migliore standardizzazione è stata redatta una tabella che consente di regolare la conta dei buds in base al tipo di microscopio utilizzato.

Per garantire che venga selezionato il campo con il maggior TB, l'ITBCC consiglia di scansionare 10 differenti campi provenienti dal fronte invasivo della neoplasia, ad ingrandimento x10.

Una volta selezionato l'hotspot si procede col conteggio dei buds ad ingrandimento x20.

La conta dei buds ottenuta dev'essere divisa per un fattore di normalizzazione stabilito dal diametro del campo di osservazione, così da poter ottenere il numero di buds su un'area di 0,785 mm².

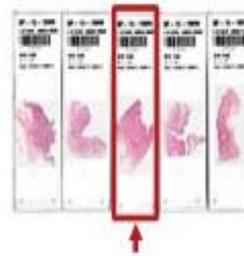
In base al numero di bud si ottengono le categorie seguenti:

- ~ Bd1 (low: 0-4 bud)
- ~ Bd2 (intermediate: 5-9 bud)
- ~ Bd3 (high: >10 bud)

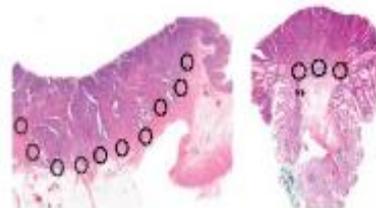
- 1 Define the field (specimen) area for the 20x objective lens of your microscope based on the eyepiece field number (FN) diameter

Objective magnification: 20		
Eyepiece FN Diameter (mm)	Specimen Area (mm ²)	Normalization Factor
18	0.630	0.810
19	0.709	0.903
20	0.785	1.000
21	0.866	1.103
22	0.950	1.210
23	1.039	1.323
24	1.131	1.440
25	1.227	1.563
26	1.327	1.690

- 2 Select the H&E slide with greatest degree of budding at the invasive front



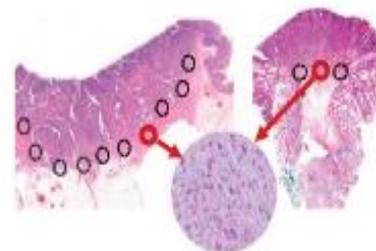
- 3 Scan 10 individual fields at medium power (10x objective) to identify the "hotspot" at the invasive front



For surgical resection specimens, scan 10 fields

For pT1 endoscopic resections (usually <10 fields available), scan all

- 4 Count tumor buds in the selected "hotspot" (20x objective)



Selected hotspot indicated in red

- 5 Divide the bud count by the normalization factor (figure 2) to determine the tumor bud count per 0.785mm²

$$\text{Tumor bud count per } 0.785 \text{ mm}^2 = \frac{\text{Bud count (20x objective)}}{\text{Normalization factor}^*}$$

Bd1 (low):	0-4 buds	per 0.785 mm ²
Bd2 (intermediate):	5-9 buds	
Bd3 (high):	≥10 buds	

Select the budding [Bd] category based on bud count and indicate the absolute count per 0.785mm² (see reporting example)

Reporting example:

Tumor budding: Bd3 (high), count 14 (per 0.785 mm²)

5) MATERIALI

A. SELEZIONE DEI CAMPIONI

Dalla casistica multicentrica di 299 adenocarcinomi dell'esofago e della giunzione esofago-gastrica sono stati presi in considerazione per il presente studio esclusivamente gli adenocarcinomi ghiandolari (240/299 – 80%), poiché il budding non è valutabile né sugli adenocarcinomi di tipo mucinoso né sugli adenocarcinomi di tipo diffuso. Sono stati esclusi anche gli adenocarcinomi di tipo misto in cui per definizione deve essere presente una componente di tipo diffusa. Tutti i casi inseriti nello studio sono rappresentati da campioni chirurgici di neoplasie che non sono state sottoposte a terapia neoadiuvante (che può modificare la valutazione del budding), raccolti da 7 centri tra il 1998 ed il 2016 (Fiocca et al., 2021).

B. RACCOLTA DEI DATI CLINICI

I dati disponibili per i pazienti considerati nello studio (anonimizzati) sono rappresentati da:

1. dati demografici: sesso, età
2. dati clinici: classificazione topografica di Siewert, stadiazione clinico-strumentale pre-intervento, recidiva, overall survival (OS), cancer specific survival (CSS)
3. dati istologici: stadiazione patologica, numero di linfonodi, numero di linfonodi metastatici, lymphnode ratio, grado di differenziazione sec WHO 2019, percentuale di componente solida poco differenziata, invasione vascolare, invasione perineurale pattern di crescita sec Ming (espansivo vs infiltrativo).

C. COLORAZIONE

Il budding è stato valutato da un patologo esperto su vetrini colorati con Ematossilina & Eosina secondo i criteri di Lugli utilizzati per l'adenocarcinoma colon-rettale (Lugli et al., 2017).

Il criterio di esclusione iniziale è rappresentato dall'istotipo.

Nel corso della valutazione è stato applicato un secondo criterio di esclusione rappresentato dalla presenza di una marcata componente infiammatoria granulocitaria sul fronte di crescita della neoplasia con lisi delle ghiandole neoplastiche.

In particolare, sono stati rivalutati tutti i vetrini di neoplasia invasiva sul fronte di crescita colorati con Ematossilina & Eosina ed è stata selezionata l'area dove si è osservata il maggior numero di buds (hotspot).

La valutazione formale è stata eseguita su microscopio ottico Leica DM 2000 utilizzando un ingrandimento 20x e con un oculare (0.785 mm²) 20x.

Il budding è stato quindi espresso come numero di buds/0.785 mm² e successivamente è categorizzato in:

- Bd1 (low) 0-4 buds
- Bd2 (intermediate) 5-9 buds
- Bd3 (high) > 10 buds

D. ANALISI STATISTICHE

Il test χ^2 o test di Fisher (numero atteso inferiore a 5) e il test di Mann-Whitney sono stati utilizzati rispettivamente per analizzare le variabili categoriche e continue.

Il bud più rilevante dal punto di vista prognostico nell'adenocarcinoma ghiandolare è stato preliminarmente definito dall'analisi delle curve ROC.

Le analisi di sopravvivenza (OS, CSS, DFS) sono state eseguite utilizzando il metodo Kaplan-Meier e il log-rank test.

Sono state eseguite analisi di regressione di Cox univariate e multivariate per stimare gli effetti dei parametri patologici sulla CSS.

Nell'analisi multivariata sono state inserite solo le variabili risultate statisticamente significative nell'analisi univariata.

Nell'analisi di regressione, sono stati utilizzati livelli di significatività di 0,05 per l'inserimento e di 0,10 per la rimozione delle rispettive variabili esplicative per determinare i fattori di rischio indipendenti.

6) RISULTATI

A. CASISTICA

Dei 240 casi di adenocarcinomi ghiandolari disponibili nella casistica originale, il budding è stato valutato in 215 casi. I mancanti 25 casi sono stati esclusi dalla valutazione per la presenza di una marcata componente infiammatoria granulocitaria sul fronte di crescita della neoplasia con lisi delle ghiandole neoplastiche.

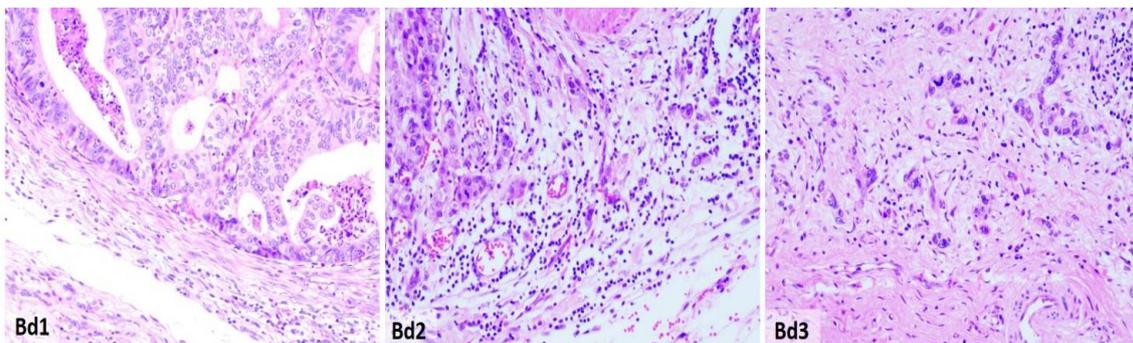
Dei 215 casi analizzati, 177 (\cong 82%) sono rappresentati da soggetti di sesso maschile e 38 di sesso femminile (\cong 17%), con una età variabile compresa tra 23 e 88 anni (media 69 anni, mediana 72 anni).

B. BUDDING

Il n° di buds rilevato sui diversi casi ha presentato dei valori compresi tra 0 e 59 buds/0.785 mm², con una mediana di buds pari a 6.

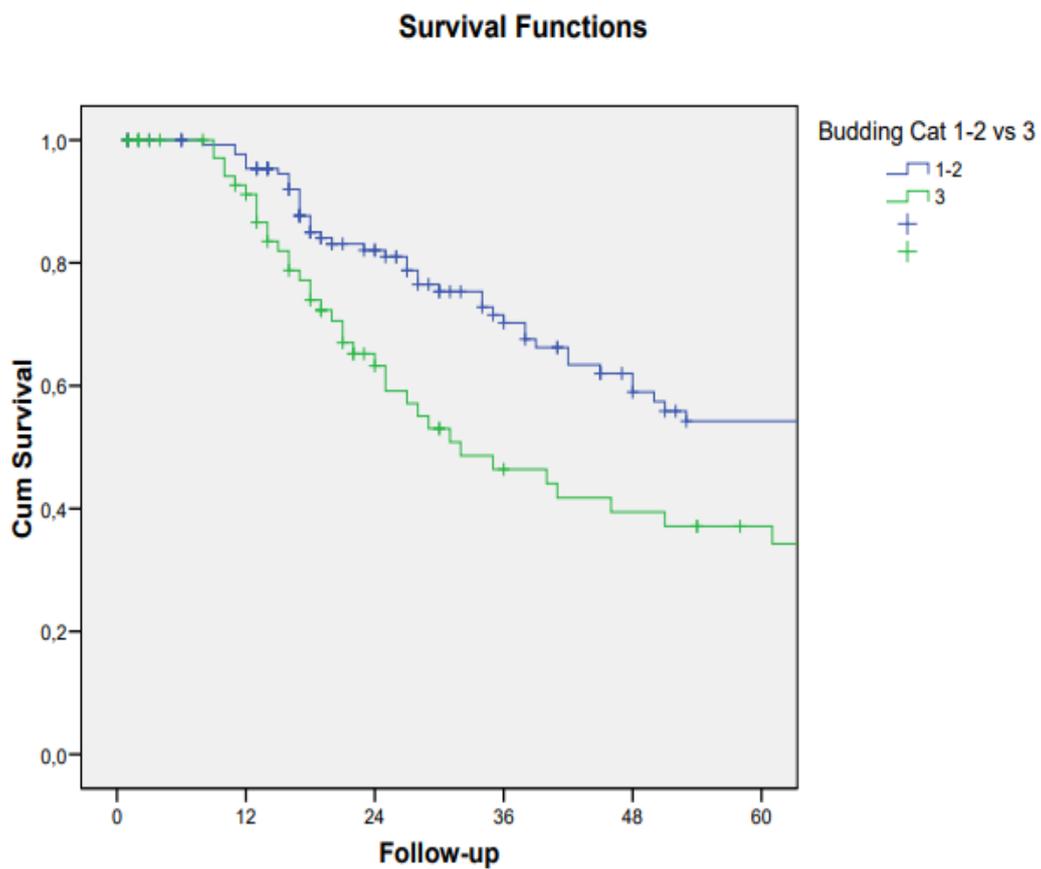
Secondo la categorizzazione di Lugli:

- 93 (\cong 43%) casi sono stati classificati come Bd1
- 46 (\cong 21%) casi come Bd2
- 76 (\cong 35%) come Bd3.



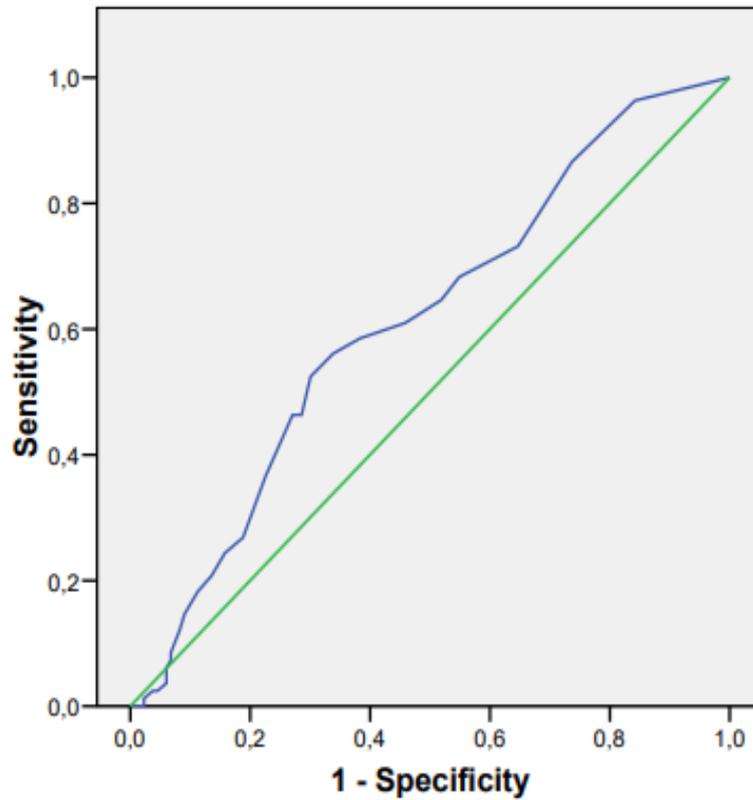
C. CORRELAZIONE BUDDING E SOPRAVVIVENZA

La categorizzazione del budding sec. Lugli ha dimostrato un importante significato prognostico con curve di sopravvivenza significativamente diverse nei pazienti con BD1-Bd2 rispetto ai pazienti con Bd3 ($p=0.002$).



Inoltre, sempre attraverso le curve ROC, si è visto che il valore pari a 8 buds è il miglior discriminante ai fini dell'identificazione di un cut-off prognostico del budding.

ROC Curve



Diagonal segments are produced by ties.

Area Under the Curve

Test Result Variable(s): Budding N

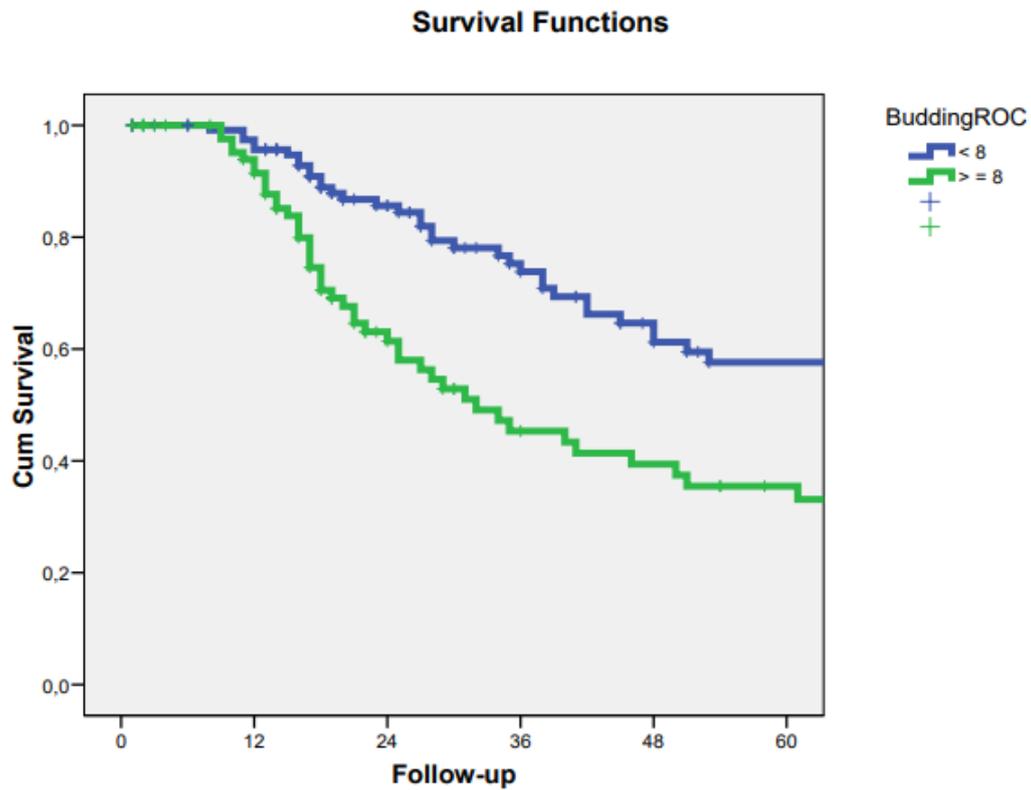
Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
,611	,039	,006	,535	,688

The test result variable(s): Budding N has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

Utilizzando tale valore cut off e distinguendo tra soggetti con <8 vs ≥ 8 buds, le curve di sopravvivenza sono risultate significativamente diverse con una riduzione della sopravvivenza nei soggetti con valori ≥ 8 buds/ 0.785 mm^2 ($p < 0.0001$).



D. CORRELAZIONE BUDDING E ISTOTIPO (adenocarcinoma ghiandolare ben differenziato vs adenocarcinoma ghiandolare poco differenziato)

Un numero maggiore di buds (in particolare bd3) è stato rilevato negli adenocarcinomi ghiandolari poco differenziati, rispetto ai carcinomi ghiandolari ben differenziati (72 rispetto a 4).

Tale differenza è risultata statisticamente significativa ($p < 0.0001$).

Budding Cat 1-2 vs 3 * EACSGE Crosstabulation

			EACSGE		Total
			GL PD	GL WD	
Budding Cat 1-2 vs 3	0	Count	52	87	139
		% within Budding Cat 1-2 vs 3	37,4%	62,6%	100,0%
	1	Count	72	4	76
		% within Budding Cat 1-2 vs 3	94,7%	5,3%	100,0%
Total		Count	124	91	215
		% within Budding Cat 1-2 vs 3	57,7%	42,3%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	66,148 ^b	1	,000		
Continuity Correction ^a	63,821	1	,000		
Likelihood Ratio	77,841	1	,000		
Fisher's Exact Test				,000	,000
N of Valid Cases	215				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 32,17.

E. CORRELAZIONE BUDDING E STADIO

BuddingROC * Stadio Crosstabulation

			Stadio				Total
			1	2	3	4	
BuddingROC	0	Count	5	42	56	21	124
		% within BuddingROC	4,0%	33,9%	45,2%	16,9%	100,0%
	1	Count	2	13	52	24	91
		% within BuddingROC	2,2%	14,3%	57,1%	26,4%	100,0%
Total		Count	7	55	108	45	215
		% within BuddingROC	3,3%	25,6%	50,2%	20,9%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	12,146 ^a	3	,007
Likelihood Ratio	12,684	3	,005
Linear-by-Linear Association	9,579	1	,002
N of Valid Cases	215		

a. 2 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,96.

Si è osservata una diversa distribuzione del budding (categorizzato in <8 vs ≥ 8) nei diversi stadi patologici:

- dei 7 pazienti con malattia in stadio 1: 5 avevano un n° di buds ≥ 8
- dei 55 pazienti con malattia in stadio 2: 13 avevano un n° di buds ≥ 8
- dei 108 pazienti con malattia in stadio 3: 52 avevano un n° di buds ≥ 8
- dei 45 pazienti con malattia in stadio 4: 24 avevano un n° di buds ≥ 8

Come si evince dalla tabella gli stadi 3 e 4 erano quelli dove il buds ≥ 8 era più frequente.

Tale dato è risultato statisticamente significativo ($p=0,007$).

F. CORRELAZIONE DELLE VARIABILI CLINICO-PATOLOGICHE E SOPRAVVIVENZA

E' stata eseguita una analisi del significato prognostico delle diverse variabili clinico-patologiche.

In analisi univariata sono risultate statisticamente significative le seguenti variabili:

- 1) istotipo ghiandolare ben differenziato vs poco differenziato ($p < 0.0001$)
- 2) pattern di crescita espansivo vs infiltrativo sec Ming ($p = 0.013$)
- 3) presenza di invasione vascolare ($p = 0.001$)
- 4) presenza di invasione perineurale ($p = 0.001$)
- 5) budding sec categorie di Lugli ($p = 0.002$)
- 6) budding con valore cut off=8 ($p < 0.0001$)

Tutti i parametri che sono risultati significativi in analisi univariata sono stati rivalutati in analisi multivariata e di questi hanno mantenuto la loro significatività:

- 1) istotipo ghiandolare ben differenziato vs poco differenziato
- 2) presenza di invasione vascolare ($p = 0.001$)
- 3) presenza di invasione perineurale ($p = 0.001$)
- 4) budding con valore cut off=8 ($p < 0.0001$)

7) DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel presente studio, su un'ampia casistica di adenocarcinomi dell'esofago e della giunzione esofago-gastrica, resecati chirurgicamente (senza trattamento neoadiuvante) sono stati selezionati solo quelli di istotipo ghiandolare, sui quali è stata applicata la categorizzazione del budding proposta da Lugli et al. nell'ITBCC del 2016, per poter valutare se il budding tumorale possa avere un ruolo prognostico significativo, ed essere così aggiunto agli altri fattori prognostici attualmente utilizzati (stadio, istotipo, invasione vascolare e perineurale).

I risultati dello studio hanno evidenziato che un budding di alto grado (Bd3) è prevalentemente espresso negli adenocarcinomi a basso grado di differenziazione (GL PD) e presenta una differenza significativa nelle curve di sopravvivenza CCS rispetto ai budding di più basso grado (Bd1 e Bd2) ($p=0.002$).

Il tumor budding, così valutato, ha mostrato un valore prognostico correlato alla sopravvivenza, statisticamente significativo in analisi univariata ($p=0,006$), ma ha perso di significatività quando è stato introdotto in analisi multivariata.

L'analisi delle curve ROC ha identificato in 8 buds/campo ($0,785 \text{ mm}^2$) il valore cut-off più informativo in relazione alla sopravvivenza.

La frequenza di un budding elevato (>8 buds per campo) è maggiore negli adenocarcinomi a basso grado di differenziazione PD ($84/124 \cong 68\%$) rispetto ai WD ($7/91 \cong 8\%$) ($p<0,001$).

Il budding, così valutato, si è dimostrato un fattore prognostico negativo sia in analisi univariata ($0,0001$) sia in analisi multivariata ($p<0,001$).

Infine, i parametri risultati significativi in analisi univariata sono stati rivalutati in analisi multivariata, tra questi hanno mantenuto la loro significatività:

1. istotipo ghiandolare ben differenziato vs poco differenziato
2. presenza di invasione vascolare ($p=0.001$)
3. presenza di invasione perineurale ($p=0.001$)
4. budding con valore cut off=8 ($p<0.0001$)

In conclusione il Tumor budding è un fattore prognostico negativo nell'adenocarcinoma ghiandolare dell'esofago e della giunzione esofago-gastrica. Il valore cut-off di 8 buds/campo è dotato di una maggiore significatività a scopo prognostico e la valutazione del Tumor Budding dovrebbe essere aggiunta a quelle degli altri fattori prognostici (stadio, istotipo, invasione vascolare e perineurale).

Bibliografia

AIOM | Associazione Italiana di Oncologia Medica – Official Website. (s.d.). Recuperato 8 luglio 2023, da <https://www.aiom.it/>

Bartley, A. N., Mills, A. M., Konnick, E., Overman, M., Ventura, C. B., Souter, L., Colasacco, C., Stadler, Z. K., Kerr, S., Howitt, B. E., Hampel, H., Adams, S. F., Johnson, W., Magi-Galluzzi, C., Sepulveda, A. R., & Broaddus, R. R. (2022). Mismatch Repair and Microsatellite Instability Testing for Immune Checkpoint Inhibitor Therapy: Guideline From the College of American Pathologists in Collaboration With the Association for Molecular Pathology and Fight Colorectal Cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *146*(10), 1194–1210. <https://doi.org/10.5858/arpa.2021-0632-CP>

Boys, J. A., Oh, D. S., Lewis, J. S., DeMeester, S. R., & Hagen, J. A. (2015). Esophageal Adenocarcinoma in Patients Younger than 40 Years: A Two-Decade Experience at a Public and Private Hospital. *The American Surgeon*, *81*(10), 974–978.

Buas, M. F., Onstad, L., Levine, D. M., Risch, H. A., Chow, W.-H., Liu, G., Fitzgerald, R. C., Bernstein, L., Ye, W., Bird, N. C., Romero, Y., Casson, A. G., Corley, D. A., Shaheen, N. J., Wu, A. H., Gammon, M. D., Reid, B. J., Hardie, L. J., Peters, U., ... Vaughan, T. L. (2015). MiRNA-Related SNPs and Risk of Esophageal Adenocarcinoma and Barrett's Esophagus: Post Genome-Wide Association Analysis in the BEACON Consortium. *PLoS One*, *10*(6), e0128617. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128617>

Chang, A. B., Oppenheimer, J. J., Kahrilas, P. J., Kantar, A., Rubin, B. K., Weinberger, M., Irwin, R. S., & CHEST Expert Cough Panel. (2019). Chronic Cough and Gastroesophageal Reflux in Children: CHEST Guideline and Expert Panel Report. *Chest*, *156*(1), 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2019.03.035>

Curtis, N. J., Noble, F., Bailey, I. S., Kelly, J. J., Byrne, J. P., & Underwood, T. J. (2014). The relevance of the Siewert classification in the era of multimodal therapy for adenocarcinoma of the gastro-oesophageal junction. *Journal of Surgical Oncology*, *109*(3), 202–207. <https://doi.org/10.1002/jso.23484>

Domper Arnal, M. J., Ferrández Arenas, Á., & Lanás Arbeloa, Á. (2015). Esophageal cancer: Risk factors, screening and endoscopic treatment in Western and Eastern countries. *World Journal of Gastroenterology*, *21*(26), 7933–7943. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i26.7933>

El-Serag, H. B., Sweet, S., Winchester, C. C., & Dent, J. (2014). Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: A systematic review. *Gut*, *63*(6), 871–880. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-304269>

Ferrioli, E., Oliveira, R. B., Matsuda, N. M., Braga, F. J., & Dantas, R. O. (1998). Aging, esophageal motility, and gastroesophageal reflux. *Journal of the American Geriatrics Society*, *46*(12), 1534–1537. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1998.tb01538.x>

Fiocca, R., Mastracci, L., Lugaresi, M., Grillo, F., D'Errico, A., Malvi, D., Spaggiari, P., Tomezzoli, A., Albarello, L., Ristimäki, A., Bottiglieri, L., Bonora, E., Krishnadath, K. K., Raulli, G. D., Rosati, R., Fumagalli Romario, U., De Manzoni, G., Räsänen, J., & Mattioli, S. (2021). The Prognostic Impact of Histology in Esophageal and Esophago-Gastric Junction Adenocarcinoma. *Cancers*, *13*(20), 5211. <https://doi.org/10.3390/cancers13205211>

Gabbert, H., Wagner, R., Moll, R., & Gerharz, C. D. (1985). Tumor dedifferentiation: An important step in tumor invasion. *Clinical & Experimental Metastasis*, *3*(4), 257–279. <https://doi.org/10.1007/BF01585081>

- Green, J. A., Amaro, R., & Barkin, J. S. (2000). Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *Digestive Diseases and Sciences*, 45(12), 2367–2368. <https://doi.org/10.1023/a:1005638924929>
- Haddad, T. S., Lugli, A., Aherne, S., Barresi, V., Terris, B., Bokhorst, J.-M., Brockmoeller, S. F., Cuatrecasas, M., Simmer, F., El-Zimaity, H., Fléjou, J.-F., Gibbons, D., Cathomas, G., Kirsch, R., Kuhlmann, T. P., Langner, C., Loughrey, M. B., Riddell, R., Ristimäki, A., ... Nagtegaal, I. D. (2021). Improving tumor budding reporting in colorectal cancer: A Delphi consensus study. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 479(3), 459–469. <https://doi.org/10.1007/s00428-021-03059-9>
- Hase, K., Shatney, C., Johnson, D., Trollope, M., & Vierra, M. (1993a). Prognostic value of tumor «budding» in patients with colorectal cancer. *Diseases of the Colon and Rectum*, 36(7), 627–635. <https://doi.org/10.1007/BF02238588>
- Hase, K., Shatney, C., Johnson, D., Trollope, M., & Vierra, M. (1993b). Prognostic value of tumor «budding» in patients with colorectal cancer. *Diseases of the Colon and Rectum*, 36(7), 627–635. <https://doi.org/10.1007/BF02238588>
- Herregods, T. V. K., Bredenoord, A. J., & Smout, A. J. P. M. (2015). Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease: New understanding in a new era. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 27(9), 1202–1213. <https://doi.org/10.1111/nmo.12611>
- Huang, Q. (2011). Definition of the esophagogastric junction: A critical mini review. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 135(3), 384–389. <https://doi.org/10.5858/2010-0162-RA.1>
- Hur, C., Miller, M., Kong, C. Y., Dowling, E. C., Nattinger, K. J., Dunn, M., & Feuer, E. J. (2013). Trends in esophageal adenocarcinoma incidence and mortality. *Cancer*, 119(6), 1149–1158. <https://doi.org/10.1002/cncr.27834>
- Hvid-Jensen, F., Pedersen, L., Drewes, A. M., Sørensen, H. T., & Funch-Jensen, P. (2011). Incidence of adenocarcinoma among patients with Barrett's esophagus. *The New England Journal of Medicine*, 365(15), 1375–1383. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103042>
- Jiang, Y., Tu, R., Lu, J., Zhang, Y., Zhu, J., Tang, W., Gu, M., Huang, C., & Gu, X. (2020). Proposed Modification of the 8th Edition of the AJCC Staging System for Gastric Cancer. *Journal of Investigative Surgery: The Official Journal of the Academy of Surgical Research*, 33(10), 932–938. <https://doi.org/10.1080/08941939.2018.1544325>
- Jobe, B. A., Richter, J. E., Hoppo, T., Peters, J. H., Bell, R., Dengler, W. C., DeVault, K., Fass, R., Gyawali, C. P., Kahrilas, P. J., Lacy, B. E., Pandolfino, J. E., Patti, M. G., Swanson, L. L., Kurian, A. A., Vela, M. F., Vaezi, M., & DeMeester, T. R. (2013). Preoperative diagnostic workup before antireflux surgery: An evidence and experience-based consensus of the Esophageal Diagnostic Advisory Panel. *Journal of the American College of Surgeons*, 217(4), 586–597. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2013.05.023>
- Kamangar, F., Dores, G. M., & Anderson, W. F. (2006). Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: Defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(14), 2137–2150. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.2308>
- Karamitopoulou, E., Zlobec, I., Kölzer, V., Kondi-Pafiti, A., Patsouris, E. S., Gennatas, K., & Lugli, A. (2013). Proposal for a 10-high-power-fields scoring method for the assessment of tumor budding in colorectal cancer. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 26(2), 295–301. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.155>
- Koelzer, V. H., Zlobec, I., & Lugli, A. (2016). Tumor budding in colorectal cancer—Ready for diagnostic practice? *Human Pathology*, 47(1), 4–19. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.08.007>

- Lightdale, C. J. (2003). *Cancer of the upper gastrointestinal tract.*: Edited by Mitchell C. Posner, Everett E. Vokes, and Ralph R. Weichselbaum. 404 pp. \$179.00. Hamilton, Ontario, Canada: BC Decker, 2002. ISBN 1-55009-101-8. Web address for ordering: www.bcdecker.com. *Gastroenterology*, *125*(3), 987a-9988. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)01138-7](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)01138-7)
- Lin, K. M., Ueda, R. K., Hinder, R. A., Stein, H. J., & DeMeester, T. R. (1991). Etiology and importance of alkaline esophageal reflux. *American Journal of Surgery*, *162*(6), 553-557. [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(91\)90107-o](https://doi.org/10.1016/0002-9610(91)90107-o)
- Liu, K., Feng, F., Chen, X.-Z., Zhou, X.-Y., Zhang, J.-Y., Chen, X.-L., Zhang, W.-H., Yang, K., Zhang, B., Zhang, H.-W., Zhou, Z.-G., & Hu, J.-K. (2019). Comparison between gastric and esophageal classification system among adenocarcinomas of esophagogastric junction according to AJCC 8th edition: A retrospective observational study from two high-volume institutions in China. *Gastric Cancer: Official Journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*, *22*(3), 506-517. <https://doi.org/10.1007/s10120-018-0890-2>
- Lugli, A., Kirsch, R., Ajioka, Y., Bosman, F., Cathomas, G., Dawson, H., El Zimaity, H., Fléjou, J.-F., Hansen, T. P., Hartmann, A., Kakar, S., Langner, C., Nagtegaal, I., Puppa, G., Riddell, R., Ristimäki, A., Sheahan, K., Smyrk, T., Sugihara, K., ... Quirke, P. (2017). Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *30*(9), 1299-1311. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.46>
- Lundell, L. R., Dent, J., Bennett, J. R., Blum, A. L., Armstrong, D., Galimiche, J. P., Johnson, F., Hongo, M., Richter, J. E., Spechler, S. J., Tytgat, G. N., & Wallin, L. (1999). Endoscopic assessment of oesophagitis: Clinical and functional correlates and further validation of the Los Angeles classification. *Gut*, *45*(2), 172-180. <https://doi.org/10.1136/gut.45.2.172>
- Mitrovic, B., Schaeffer, D. F., Riddell, R. H., & Kirsch, R. (2012). Tumor budding in colorectal carcinoma: Time to take notice. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *25*(10), 1315-1325. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.94>
- Murphy, K. M., Zhang, S., Geiger, T., Hafez, M. J., Bacher, J., Berg, K. D., & Eshleman, J. R. (2006). Comparison of the microsatellite instability analysis system and the Bethesda panel for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, *8*(3), 305-311. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2006.050092>
- Naini, B. V., Souza, R. F., & Odze, R. D. (2016). Barrett's Esophagus: A Comprehensive and Contemporary Review for Pathologists. *The American Journal of Surgical Pathology*, *40*(5), e45-66. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000598>
- Nakamura, T., Mitomi, H., Kanazawa, H., Ohkura, Y., & Watanabe, M. (2008). Tumor budding as an index to identify high-risk patients with stage II colon cancer. *Diseases of the Colon and Rectum*, *51*(5), 568-572. <https://doi.org/10.1007/s10350-008-9192-9>
- Nakamura, T., Mitomi, H., Kikuchi, S., Ohtani, Y., & Sato, K. (2005). Evaluation of the usefulness of tumor budding on the prediction of metastasis to the lung and liver after curative excision of colorectal cancer. *Hepato-Gastroenterology*, *52*(65), 1432-1435.
- Oki, E., Oda, S., Maehara, Y., & Sugimachi, K. (1999). Mutated gene-specific phenotypes of dinucleotide repeat instability in human colorectal carcinoma cell lines deficient in DNA mismatch repair. *Oncogene*, *18*(12), 2143-2147. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202583>

- Patel, N., & Benipal, B. (2018). Incidence of Esophageal Cancer in the United States from 2001-2015: A United States Cancer Statistics Analysis of 50 States. *Cureus*, *10*(12), e3709. <https://doi.org/10.7759/cureus.3709>
- Pinto, R., Hauge, T., Jeanmougin, M., Pharo, H. D., Kresse, S. H., Honne, H., Winge, S. B., Five, M.-B., Kumar, T., Mala, T., Hauge, T., Johnson, E., & Lind, G. E. (2022). Targeted genetic and epigenetic profiling of esophageal adenocarcinomas and non-dysplastic Barrett's esophagus. *Clinical Epigenetics*, *14*, 77. <https://doi.org/10.1186/s13148-022-01287-7>
- Pritchett, J. M., Aslam, M., Slaughter, J. C., Ness, R. M., Garrett, C. G., & Vaezi, M. F. (2009). Efficacy of esophageal impedance/pH monitoring in patients with refractory gastroesophageal reflux disease, on and off therapy. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, *7*(7), 743–748. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2009.02.022>
- Rastogi, A., Puli, S., El-Serag, H. B., Bansal, A., Wani, S., & Sharma, P. (2008). Incidence of esophageal adenocarcinoma in patients with Barrett's esophagus and high-grade dysplasia: A meta-analysis. *Gastrointestinal Endoscopy*, *67*(3), 394–398. <https://doi.org/10.1016/j.gie.2007.07.019>
- Rice, T. W., Blackstone, E. H., & Rusch, V. W. (2010). 7th edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Esophagus and esophagogastric junction. *Annals of Surgical Oncology*, *17*(7), 1721–1724. <https://doi.org/10.1245/s10434-010-1024-1>
- Rice, T. W., Gress, D. M., Patil, D. T., Hofstetter, W. L., Kelsen, D. P., & Blackstone, E. H. (2017). Cancer of the esophagus and esophagogastric junction-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *67*(4), 304–317. <https://doi.org/10.3322/caac.21399>
- Richter, J. E. (2000). Gastroesophageal reflux disease in the older patient: Presentation, treatment, and complications. *The American Journal of Gastroenterology*, *95*(2), 368–373. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2000.t01-1-01791.x>
- Roman, S., Gyawali, C. P., Savarino, E., Yadlapati, R., Zerbib, F., Wu, J., Vela, M., Tutuian, R., Tatum, R., Sifrim, D., Keller, J., Fox, M., Pandolfino, J. E., Bredenoord, A. J., & GERD consensus group. (2017). Ambulatory reflux monitoring for diagnosis of gastro-esophageal reflux disease: Update of the Porto consensus and recommendations from an international consensus group. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, *29*(10), 1–15. <https://doi.org/10.1111/nmo.13067>
- Savarino, E., Zentilin, P., & Savarino, V. (2013). NERD: An umbrella term including heterogeneous subpopulations. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *10*(6), 371–380. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.50>
- Shaheen, N. J., Falk, G. W., Iyer, P. G., Gerson, L. B., & American College of Gastroenterology. (2016). ACG Clinical Guideline: Diagnosis and Management of Barrett's Esophagus. *The American Journal of Gastroenterology*, *111*(1), 30–50; quiz 51. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.322>
- Sharma, P., Dent, J., Armstrong, D., Bergman, J. J. G. H. M., Gossner, L., Hoshihara, Y., Jankowski, J. A., Junghard, O., Lundell, L., Tytgat, G. N. J., & Vieth, M. (2006). The development and validation of an endoscopic grading system for Barrett's esophagus: The Prague C & M criteria. *Gastroenterology*, *131*(5), 1392–1399. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.08.032>

- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *65*(1), 5–29. <https://doi.org/10.3322/caac.21254>
- Siewert, J. R., Feith, M., & Stein, H. J. (2005). Biologic and clinical variations of adenocarcinoma at the esophago-gastric junction: Relevance of a topographic-anatomic subclassification. *Journal of Surgical Oncology*, *90*(3), 139–146; discussion 146. <https://doi.org/10.1002/jso.20218>
- Siewert, J. R., Hölscher, A. H., Becker, K., & Gössner, W. (1987). [Cardia cancer: Attempt at a therapeutically relevant classification]. *Der Chirurg; Zeitschrift Fur Alle Gebiete Der Operativen Medizin*, *58*(1), 25–32.
- Siewert, J. R., & Stein, H. J. (1998). Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. *The British Journal of Surgery*, *85*(11), 1457–1459. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2168.1998.00940>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Ueno, H., Mochizuki, H., Hashiguchi, Y., Shimazaki, H., Aida, S., Hase, K., Matsukuma, S., Kanai, T., Kurihara, H., Ozawa, K., Yoshimura, K., & Bekku, S. (2004). Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. *Gastroenterology*, *127*(2), 385–394. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.04.022>
- Ueno, H., Murphy, J., Jass, J. R., Mochizuki, H., & Talbot, I. C. (2002). Tumour «budding» as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology*, *40*(2), 127–132. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2002.01324.x>
- Vakil, N., van Zanten, S. V., Kahrilas, P., Dent, J., Jones, R., & Global Consensus Group. (2006). The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: A global evidence-based consensus. *The American Journal of Gastroenterology*, *101*(8), 1900–1920; quiz 1943. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00630.x>
- van Beek, J., zur Hausen, A., Klein Kranenbarg, E., van de Velde, C. J. H., Middeldorp, J. M., van den Brule, A. J. C., Meijer, C. J. L. M., & Bloemena, E. (2004). EBV-positive gastric adenocarcinomas: A distinct clinicopathologic entity with a low frequency of lymph node involvement. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *22*(4), 664–670. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.08.061>
- Wang, L. M., Kevans, D., Mulcahy, H., O’Sullivan, J., Fennelly, D., Hyland, J., O’Donoghue, D., & Sheahan, K. (2009). Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *The American Journal of Surgical Pathology*, *33*(1), 134–141. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e318184cd55>
- Yanai, H., Nishikawa, J., Mizugaki, Y., Shimizu, N., Takada, K., Matsusaki, K., Toda, T., Matsumoto, Y., Tada, M., & Okita, K. (1997). Endoscopic and pathologic features of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Gastrointestinal Endoscopy*, *45*(3), 236–242. [https://doi.org/10.1016/s0016-5107\(97\)70265-7](https://doi.org/10.1016/s0016-5107(97)70265-7)
- Yokoyama, H., & Nagayo, T. (1986). [Initial changes in the development of gastric cancer]. *Gan No Rinsho. Japan Journal of Cancer Clinics*, *32*(3), 250–256.
- Zlobec, I., & Lugli, A. (2018). Tumour budding in colorectal cancer: Molecular rationale for clinical translation. *Nature Reviews. Cancer*, *18*(4), 203–204. <https://doi.org/10.1038/nrc.2018.1>

