



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Facoltà di Medicina e Psicologia

**Dipartimento di Scienze Medico-Chirurgiche
e di Medicina Traslazionale**

**Dottorato di Ricerca in Oncologia
XXIX Ciclo**

**Significato clinico-patologico e valore prognostico
dell'analisi citopatologica del lavaggio gastrico
in 80 pazienti affetti da adenocarcinoma dello stomaco**

Relatore:

Prof.ssa Genoveffa Balducci

Dottorando:

Dott. Edoardo Virgilio

Correlatore:

Prof. Paolo Mercantini

Ai pazienti
di questo studio,
poiché
i numeri
sono nomi propri
e le statistiche
i punti di incontro
tra le loro paure
e le loro speranze.

INDICE

	Pagina
Introduzione	1
Epidemiologia	4
Anatomia Patologica	6
Stadiazione	10
Trattamento	22
La Letteratura sulla citologia del succo gastrico/ lavaggio gastrico nei pazienti affetti da adenocarcinoma dello stomaco	24
Obiettivo dello Studio	29
Materiali e Metodi	30
Risultati	40
Discussione	62
Conclusioni	71
Bibliografia	72
Ringraziamenti	79

1. INTRODUZIONE

Sebbene la sua incidenza stia diminuendo negli ultimi anni, il cancro dello stomaco rappresenta tuttora il quinto tumore più diffuso al mondo (dopo polmone, seno, prostata e colon-retto) e la terza causa di morte per tumore dopo il cancro del polmone e del fegato.¹

Il successo registrato in Giappone nel campo della diagnosi precoce del cancro gastrico (early gastric cancer, EGC) viaggia purtroppo su binari molto differenti rispetto a quelli dei Paesi Occidentali nei quali questo tumore viene spesso riscontrato ancora nei suoi stadi più avanzati.^{2,3}

Tale neoplasia è gravata da una prognosi piuttosto infausta dal momento che il tasso di sopravvivenza globale a 5 anni si aggira intorno al 20%. Infatti, anche dopo una resezione chirurgica curativa, dove il campione operatorio ha margini indenni da infiltrazione neoplastica, circa il 50% dei pazienti muore per recidiva locale di malattia che si manifesta in genere entro 2 anni di follow-up.⁴⁻⁷

Il tasso di sopravvivenza globale a 5 anni è fortemente correlato alla stadiazione determinata al momento della diagnosi.

Sebbene molti parametri patobiologici classificativi e stadiativi siano ben studiati e universalmente riconosciuti riguardo al loro significato clinico e prognostico, esistono ancora molte ombre circa la capacità di prevedere esattamente come tale tumore possa evolvere nella sua storia naturale per un dato e noto stadio tra i vari pazienti affetti.

A tutt'oggi, per esempio, mentre per alcuni tumori sono stati identificati determinati marcatori tumorali sierici (ormoni antigenici) utili allo screening, diagnosi o prognosi degli stessi (in particolare l'alfa-fetoproteina per l'epatocarcinoma, il Ca 19.9 per l'adenocarcinoma pancreatico o il colangiocarcinoma, il CEA per l'identificazione di malattia colo-rettale recidiva o metastatica), per l'adenocarcinoma gastrico nessun marcatore ha raggiunto elevati livelli di sensibilità né di specificità per gli scopi sopra descritti.⁸⁻¹⁶

Quanto alla citopatologia, negli ultimi anni diversi lavori hanno ormai consolidato il ruolo dell'analisi citopatologia del lavaggio peritoneale: il riscontro di cellule cancerose in questo

materiale biologico ha, infatti, una sicura valenza prognostica (in termini negativi) per questo tipo di pazienti.¹⁷⁻¹⁹

Nasce quindi dalle considerazioni summenzionate l'intento di questo studio: analizzare il lavaggio gastrico dei pazienti affetto da adenocarcinoma gastrico esaminando la presenza (o l'assenza) delle cellule cancerose in esso esfoliate al fine di cercare di identificare un ulteriore possibile parametro utile alla classificazione, prognosi, terapia e monitoraggio. Di interesse, come si evince dalla letteratura scientifica mondiale, prima del nostro gruppo di ricerca nessuno ha condotto questa linea di studio in quanto, per quanto riguarda il cancro dello stomaco, finora l'analisi citopatologica del lavaggio gastrico è stata eseguita con il solo intento diagnostico.

2. EPIDEMIOLOGIA

Nonostante anche in Italia, così come nel resto del mondo, si stia assistendo sia negli uomini che nelle donne, specialmente in virtù della corretta alimentazione e conservazione dei prodotti alimentari, ad una costante riduzione di incidenza e mortalità (oltre -3%/anno come variazione in incidenza e -3.5%/anno come variazione in mortalità in entrambi i sessi), il carcinoma dello stomaco continua ad essere una delle principali cause neoplastiche di malattia e morte. Infatti, secondo l'Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM) e l'Associazione Italiana dei Registri Tumori (AIRTUM), nel 2014 si sono registrati 14500 nuovi casi di carcinoma gastrico e circa 10000 decessi.²⁰

Nel complesso, il carcinoma gastrico rappresenta circa il 4% di tutti i tumori in entrambi i sessi ed è al quinto posto come incidenza negli uomini (5% di tutti i tumori negli uomini) e al sesto posto nelle donne (3% di tutte le neoplasie femminili).

Con circa il 7% dei decessi, il carcinoma gastrico è attualmente la quinta causa di morte per cancro in entrambi i sessi.

Nel periodo 2005-2007, in Italia la sopravvivenza a 5 anni è risultata essere intorno al 35% (34% nei maschi e 36% nelle femmine).

Così come in Europa (dove si distinguono paesi a elevata incidenza come Portogallo, Estonia, Lituania e Slovenia, a incidenza intermedia come Italia, Spagna, Romania e Slovacchia e paesi a incidenza minore come Regno Unito, Francia Norvegia e Svezia), anche in Italia esiste una notevole variazione geografica in termini di incidenza. L'Italia centrale ha la più alta incidenza rilevata (26 casi/100000 negli uomini e 13 casi/100000 nelle donne), il Nord mostra un'incidenza intermedia (22 casi/100000 negli uomini e 11 casi/100000 nelle donne) mentre al Meridione appartiene l'incidenza più bassa (16 casi/100000 negli uomini e 7 casi/100000 nelle donne). La mortalità tra le diverse aree geografiche riflette con coerenza i dati d'incidenza.²⁰

Negli Stati Uniti d'America, similmente, i dati epidemiologici pubblicati nel 2007 da Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) e relativi al decennio 1998-2007 hanno offerto risultati sovrapponibili in termini d'incidenza per sesso, età e anno; è degna di nota, inoltre, la descrizione fatta sull'andamento prognostico in base allo stadio al momento della diagnosi e il tempo trascorso successivamente.²¹

3. ANATOMIA PATOLOGICA

L'adenocarcinoma gastrico rappresenta la forma istologica più comune di tutte le neoplasie maligne dello stomaco (più del 95%). Come per altre neoplasie, alla sua carcinogenesi contribuiscono fattori genetici, ereditari, familiari, ambientali e stocastici passando per condizioni precancerose tra le quali la gastrite cronica atrofica, gli adenomi gastrici e la metaplasia intestinale.

Numerose sono le classificazioni anatomopatologiche proposte per il cancro dello stomaco.

Per quanto riguarda il cancro gastrico avanzato, la prima classificazione fu quella avanzata da Borrmann nel 1926 e prevede 4 tipi macroscopici:

1. Tipo 1 o polipoide
2. Tipo 2, ulcerato con margini rilevati
3. Tipo 3, ulcerato infiltrante la parete circostante
4. Tipo 4 o diffusamente infiltrante (linite plastica).

Essendo prettamente di tipo morfologico (macroscopico), tale descrizione fu rivisitata nel 1942 da Broders che la arricchì di caratteristiche istologiche. La nuova classificazione prevede

così 4 gradi istologici:

1. Nel grado 1 le cellule lesionali, con nuclei alti e larghi, sono organizzate in ghiandole gastriche normali.
2. Nel grado 2 le cellule mostrano maggiori alterazioni nucleari (nuclei larghi e ipercromici con un significativo numero di mitosi) e sono disposte meno perfettamente nelle ghiandole.
3. Nel grado 3 le dimensioni dei nuclei sono ancora più variabili e la tendenza a formare ghiandole è più rara.
4. Nel grado 4 le cellule neoplastiche hanno membrane citoplasmatiche irregolari, nuclei ipercromici e possono essere giganti o ad anello con castone. Classicamente esse non sono organizzate in ghiandole.

La classificazione di Lauren, introdotta nel 1965 e tuttora ampiamente utilizzata nella pratica clinica, basa il suo successo sul fatto di avere un chiaro significato epidemiologico, eziologico, patologico e prognostico. Essa distingue 2 sottotipi istologici:

1. il sottotipo intestinale ha una struttura ghiandolare che ricorda il cancro del colon, con una diffusa

infiltrazione di cellule infiammatorie e frequente metaplasia intestinale;

2. il sottotipo diffuso consta di piccoli clusters di piccole cellule, mostra tropismo per la mucosa, ha una minore componente infiammatoria ed è classicamente gravato da una prognosi peggiore.

La classificazione WHO, anch'essa microscopica, suddivide il carcinoma gastrico nelle seguenti forme:

1. tubulare
2. papillare
3. mucinoso
4. poco coesivo (>50% con cellule ad anello con castone)

Una menzione particolare merita l'Early Gastric Cancer (cancro gastrico iniziale, EGC) nel quale il tumore è confinato alla sola mucosa (m) e/o alla sottomucosa (sm) (ovvero i primi due strati tissutali dell'organo) indipendentemente dalla presenza o meno di metastasi linfonodali. La classificazione macroscopica dell'EGC della Japanese Gastric Cancer Association, adottata e riadattata secondo Parigi 2002, distingue 3 tipi con corrispondenti sottotipi:

1. tipo rilevato, circa il 3% dei casi
2. tipo piatto, il più frequente, circa il 78% dei casi
3. tipo depresso, circa il 2% dei casi.

Queste neoplasie sono caratterizzate da una prognosi migliore (90% di sopravvivenza a 5 anni) rispetto al cancro gastrico avanzato e, in relazione all'assente o ridotto rischio di metastasi linfonodali, sono da considerare suscettibili di resezione endoscopica, anziché chirurgica, con intenti di radicalità.

4. STADIAZIONE

La stadiazione dell'adenocarcinoma gastrico rappresenta un argomento controverso per molti aspetti.

Innanzitutto va detto che non esiste un'uniformità nel sistema di stadiazione tra Oriente e Occidente: infatti, in Giappone vige la stadiazione supportata dalla Società Giapponese per la Ricerca sul Cancro Gastrico (Japanese Research Society for Gastric Cancer – JRSGC), mentre il resto del mondo (Italia compresa) ricorre alla stadiazione TNM creata dalla collaborazione tra l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) e la Union International Contre le Cancer (UICC) e che è giunta nel 2010 alla sua settima edizione²².

La classificazione clinica pre-trattamento viene indicata come **cTNM** e si basa sull'apporto fornito da esame obiettivo, dati di laboratorio, strumentali ed imaging.

La classificazione patologica viene etichettata come **pTNM** e viene fornita dall'analisi del pezzo operatorio prelevato mediante l'intervento chirurgico.

Stadio 0	Tis N0 M0
Stadio IA	T1 N0 M0
Stadio IB	T2 N0 M0 T1 N1 M0
Stadio IIA	T3 N0 M0 T2 N1 M0 T1 N2 M0
Stadio IIB	T4a N0 M0 T3 N1 M0 T2 N2 M0 T1 N3 M0
Stadio IIIA	T4a N1 M0 T3 N2 M0 T2 N3 M0
Stadio IIIB	T4b N0-1 M0 T4a N2 M0 T3 N3 M0
Stadio IIIC	T4a N3 M0 T4b N2-3 M0
Stadio IV	ogni T ogni N M1

Stadiazione TNM del cancro gastrico sec AJCC 2010, VII

Edizione

La classificazione post-trattamento è targata come **yTNM** e documenta l'estensione della malattia valutata durante o dopo un trattamento neoadiuvante multimodale chemioterapico e radioterapico o quando la chemioterapia o la radioterapia sono trattamenti primari senza resezione chirurgica. Pertanto essa

risulta essere di grande ausilio nel guidare la successiva scelta terapeutica, sia medica sia chirurgica.

Inoltre, sono stati definiti nella VII edizione del TNM anche altri due tipi di classificazione dello stadio:

- la classificazione autoptica (**aTNM**) è utilizzata per la stadiazione delle neoplasie identificate post-mortem. Il suffisso **m** indica la presenza di tumori primari multipli in un singolo sito e viene indicato tra parentesi, ad esempio pT(m)NM.
- la classificazione re-treatment, che utilizza il prefisso **rTNM**, viene impiegata per indicare un tumore recidivato dopo un intervallo libero da malattia e non modifica la classificazione originaria clinica o patologica del tumore.

4.1 Parametro T

Lo spessore dell'invasione della parete gastrica da parte del tumore (T) viene distinto in **T1a**, se invade la lamina propria o la muscularis mucosae e in **T1b**, se invade la sottomucosa; **T2** indica l'invasione della muscularis propria e **T3** l'invasione del tessuto connettivo sottosieroso, senza invasione delle strutture adiacenti o della sierosa (peritoneo viscerale); il tumore **T4** può penetrare la sierosa (**T4a**) o invadere le strutture adiacenti (**T4b**). La definizione patologica del tumore primitivo (pT) necessita dell'asportazione della neoplasia.

TX	il tumore primario non può essere valutato.
T0	non evidenza di tumore primario.
T1	tumore che invade la lamina propria, la <i>muscularis mucosae</i> o la sottomucosa; T1a: tumore che invade la lamina propria o la <i>muscularis mucosae</i> ; T1b: tumore che invade la sottomucosa.
T2	tumore che invade la muscolare propria.
T3	tumore che invade la sottosierosa.
T4	tumore che perfora la sierosa o invade le strutture adiacenti; T4a: tumore che perfora la sierosa; T4b: tumore che invade le strutture adiacenti.

Parametro T per il cancro gastrico secondo AJCC 2010, VII Edizione

I tumori che si estendono al legamento gastrocolico o gastroduodenale oppure all'omento, senza perforazione del peritoneo viscerale, sono classificati come pT3. Se è presente perforazione del peritoneo viscerale, il tumore deve essere classificato come pT4. Inoltre, è necessaria la conferma microscopica di invasione di strutture adiacenti come milza, colon trasverso, fegato, diaframma, pancreas, parete addominale, surrene, rene, intestino tenue e retroperitoneo per classificare il tumore come T4b.

A tutt'oggi il pT -così come il pN- è considerato uno dei principali fattori prognostici del carcinoma gastrico.

4.2 Parametro N

Questo parametro valuta i linfonodi regionali infiltrati o meno dal tumore, indicandone il numero. Un'adeguata dissezione linfonodale di queste stazioni loco-regionali è importante per assicurare l'appropriata classificazione del pN. Sebbene venga consigliata la rimozione di **almeno 16 linfonodi**, un pN0 viene assegnato sulla base del numero attuale di linfonodi valutati all'esame microscopico.

I linfonodi regionali sono definiti dai linfonodi perigastrici che si localizzano lungo la piccola e grande curva.

Le aree di drenaggio linfatico regionale vengono così classificate:

a) stazioni linfonodali della grande curva dello stomaco: linfonodi della grande curva, grande omento, paracardiali sinistri, gastroepiploici, sottopilorici, pancreatico-duodenali;

b) stazioni linfonodali dell'area pancreatica e splenica: linfonodi pancreaticolienali, peripancreatici, splenici;

c) stazioni linfonodali della piccola curva dello stomaco: piccola curva, piccolo omento, arteria gastrica di sinistra, cardioesofagei, arteria epatica comune, tripode celiaco, epato-duodenali.

Le aree di drenaggio linfatico a distanza vengono così classificate:

d) gruppo linfonodale a distanza: linfonodi retropancreatici, para-aortici, portalì, retroperitoneali, mesenterici.

Il **pN1** richiede la conferma microscopica di metastasi in 1 o 2 linfonodi perigastrici.

Il **pN2** richiede la conferma microscopica di metastasi in 3-6 linfonodi loco-regionali.

Il **pN3** richiede la presenza di almeno 7 linfonodi loco-regionali infiltrati. Questa categoria, nell'ultima revisione del TNM, è stata suddivisa in due sottocategorie: **pN3a**, se sono presenti da 7 a 15 linfonodi infiltrati e **pN3b** se sono infiltrati più di 15 linfonodi loco-regionali (vedi tabella sottostante).

A tutt'oggi il pN, così come il pT, è considerato il più importante fattore prognostico del carcinoma gastrico.

NX	i linfonodi regionali non possono essere valutati
N0	nessuna metastasi nei linfonodi regionali
N1	metastasi in 1 o 2 linfonodi regionali
N2	metastasi in 3-6 linfonodi regionali
N3	metastasi in 7 o più linfonodi regionali N3a: metastasi in 7-15 linfonodi regionali N3b: metastasi in 16 o più linfonodi regionali

Parametro N del cancro gastrico secondo AJCC 2010, VII Ed.

4.3 Parametro M

La classificazione M indica la presenza di metastasi. La distribuzione più frequente dei siti metastatici è quella epatica, peritoneale e linfonodale a distanza. Le localizzazioni polmonari e cerebrali sono meno frequenti. Anche una citologia peritoneale positiva per cellule neoplastiche indica la presenza di malattia metastatica.

L'accertamento patologico di metastasi a distanza implica l'esame microscopico.

La nuova edizione del TNM abolisce la categoria Mx, che non è considerata appropriata, poiché la valutazione di eventuali siti metastatici può essere eseguita con l'esame obiettivo.

L'utilizzo del parametro Mx comporta l'esclusione dalla stadiazione (vedi tabella sottostante).

MX	Tale categoria viene abolita in quanto non è considerata appropriata, poiché la valutazione delle metastasi può essere eseguita con l'esame obiettivo.
M0	Non metastasi a distanza.
M1	Presenza di metastasi a distanza comprese la diffusione peritoneale, la citologia peritoneale positiva e l'infiltrazione dell'omento, se non in contiguità con il tumore primitivo.

Parametro M per il cancro gastrico secondo AJCC 2010, VII

Edizione

4.4 Punti critici della stadiazione TNM del tumore gastrico

La validità dei sistemi di stadiazione viene minata dalla mancata considerazione, e quindi eventuale inclusione tra i criteri di stadiazione, del tipo di strategia terapeutica specifica (intervento chirurgico, chemioterapia, radioterapia, trattamento neoadiuvante a fronte di quello adiuvante).

Per quanto riguarda la stadiazione TNM, sono numerose le informazioni patobiologiche che tuttora non vengono contemplate: tra queste, la sede di origine (cardio-fundica a fronte di quella antro-pilorica), il sottotipo istologico (intestinale o diffuso), il grado di interessamento della sierosa così come la ratio linfonodale (numero dei linfonodi metastatici rapportati a quelli asportati, abbreviato con LN ratio o N ratio o MLR-metastatic lymph node ratio) e molte altre. Tale deficit sembra limitare non poco la validità della stessa. Per questo motivo, nel corso degli anni, la suddetta TNM è stata affiancata da importanti *fattori prognostici e predittivi di malattia* che vengono discussi qui di seguito.

4.5 Fattori prognostici e predittivi

Rappresentano quelle informazioni patobiologiche la cui presenza è stata dimostrata associarsi e/o influire in maniera scientifica (ossia scientificamente significativa e clinicamente rilevante) sul destino dei pazienti affetti da tale neoplasia sia in assenza (prognosi) che in presenza (predizione) di terapia (fattori negativi di sopravvivenza). Tali informazioni, pur non essendo strettamente contemplate dalla stadiazione TNM, le vengono ormai comunemente affiancate vista la validità della letteratura dedicata. Illustriamo qui di seguito alcuni dei più interessanti:

- 1) la classificazione del tumore residuo (**R**) viene sempre più frequentemente utilizzata per completare il sistema di stadiazione TNM; **R0** indica una resezione curativa, **R1** un residuo microscopico del tumore e **R2** un residuo macroscopico.
- 2) Il sistema stadiativo giapponese include numerosi e importanti fattori prognostici²³; innanzitutto esso contempla la **localizzazione del tumore primitivo** secondo cui il carcinoma gastrico prossimale (es., tumori del terzo prossimale dello stomaco, incluso il cardias e la giunzione gastroesofagea) determina una prognosi sfavorevole rispetto

ai tumori distali. In secondo luogo, viene dato maggiore risalto ai linfonodi coinvolti mediante un'accurata classificazione delle **stazioni di drenaggio linfatico** dello stomaco.²⁵ In terzo luogo, in riferimento alle **metastasi a distanza**, acquisiscono una certa considerazione le metastasi **epatiche** (distinte in Hx: impossibilità di valutarle, H0: assenti e H1: presenti) così come quelle **peritoneali** (distinte, in modo analogo alle precedenti, in Px, P0, P1). Infine viene tenuto in considerazione il parametro della **citologia peritoneale**: CYx sta per lavaggio peritoneale non eseguito, CY0 indica un'assenza di riscontro di atipie cellulari mentre CY1 indica una positività nel reclutamento di cellule neoplastiche mediante tale lavaggio.

- 3) La **Performance status** del paziente, includendo la perdita di peso, vomito, anoressia, anemia e le altre alterazioni cliniche, laboratoristiche e strumentali di grado severo.
- 4) L'invasione linfovascolare (**LV1 o LV2 versus LV0**) e quella perineurale (**Pn1 versus Pn0**) sono altri fattori prognostici sfavorevoli.
- 5) La ratio dei linfonodi metastatici (numero dei linfonodi metastatici rispetto al numero totale dei linfonodi resecati,

LNR, N ratio o MLR) appare un importante fattore prognostico indipendente ed è considerato da alcuni come il miglior sistema classificativo per le metastasi linfonodali per la sua capacità di superare il fenomeno della “stage migration”. Quest’ultimo si verifica più comunemente quando vengono eseguite linfadenectomie meno estese ossia nel caso in cui la valutazione di un numero inadeguato di linfonodi conduce a sottostadiare e conseguentemente sottostimare la gravità della malattia.

6) Il livello del **CEA sierico preoperatorio** ha un valore predittivo nel determinare lo stadio tumorale e fornisce un’informazione prognostica per i pazienti con carcinoma gastrico potenzialmente resecabile nel preoperatorio. I pazienti operati radicalmente hanno una prognosi peggiore quando il CEA preoperatorio è più elevato rispetto ai pazienti con più bassi livelli, nonostante l’aggiustamento per i fattori prognostici più importanti.

7) **Fattori prognostici biologici** (patologia molecolare): i risultati pubblicati sulla determinazione della p53 nel carcinoma gastrico in relazione alla prognosi hanno mostrato risultati spesso contraddittori, possibilmente legati alla diversa determinazione immunoistochimica e/o

immunoradiometrica. Altri suggeriscono come fattori biologici prognostici l'espressione della p21, l'espressione del VEGF o la conta della densità micro vascolare, l'iperespressione dell'EGF-R, della ciclina D2, le alterazioni del BAT-26, dell'uPA (attivatore del plasminogeno tipo urokinasi) e del PAI-1 (inibitore dell'attivatore del plasminogeno), dei livelli sierici di recettore solubile dell'IL-2 (SolIL-2R) o di alcuni fattori correlati alla proliferazione cellulare, come la frazione di fase S, il Ki-67 o l'antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA).

5. TRATTAMENTO

La resezione chirurgica seguita da chemioterapia adiuvante resta la sola possibilità di trattamento curativo per i pazienti affetti dal carcinoma dello stomaco.²⁴⁻²⁶ Per le lesioni localmente avanzate ($T \geq 3$ o N+) esistono dei trials clinici prospettici randomizzati che hanno dimostrato come la somministrazione della chemioterapia neoadiuvante offra, rispetto alla sola chirurgia, migliori risultati in termini di resecabilità, riduzione del tasso di recidiva locale e di sopravvivenza globale (intendendo, quindi, quella sia senza sia con malattia).²⁷⁻³¹

L'intervento chirurgico di gastrectomia (parziale o totale a seconda della localizzazione del tumore) deve prevedere una linfadenectomia loco-regionale di almeno 16 linfonodi (tale è il valore numerico ritenuto convenzionalmente adeguato per una corretta stadiazione linfonodale). Le linee guida europee e statunitensi concordano nell'indicare come standard una linfadenectomia D2 (linfonodi perigastrici e di secondo livello) con conservazione della milza e della coda pancreatica. Tale conclusione è conforme ai risultati ottenuti da molteplici

studi condotti negli ultimi anni dimostranti che linfadenectomie molto estese non determinano alcun tipo di beneficio e anzi sono gravate da un tasso più elevato di morbidità.

6. La Letteratura sulla citopatologia del succo gastrico/lavaggio gastrico nei pazienti affetti da adenocarcinoma dello stomaco

L'applicazione della citologia nella diagnosi del cancro gastrico fu sperimentata per la prima volta nel 1909 da Marini.³² Venne successivamente abbandonata per tornare a suscitare interesse con gli studi di Papanicolau e Cooper, sull'onda della fortuna riscontrata nel campo ginecologico ed anche in quello broncopolmonare.³³⁻³⁷ Lo sviluppo della citologia gastrica, così come quella della biopsia istologica, è successiva al miglioramento dei dispositivi endoscopici (il tubo endoscopico flessibile) così come testimoniato dai primi lavori riguardanti la citologia gastrica pubblicati in Giappone agli inizi degli anni '60.³⁸ La mole dei lavori dedicati comparsi dal 1946 a oggi attribuiscono a quest'indagine un ruolo senza dubbio riconosciuto nella diagnosi del cancro gastrico. Tuttavia, la citologia eseguita su succo o lavaggio gastrico può solo aggiungersi e non sostituirsi all'esame biptico istologico che rappresenta l'indagine più certa per la diagnosi specifica. Diversi lavori hanno dimostrato come l'utilizzo combinato

della triplice tecnica (gastroscopia, biopsia e citologia) giochi un ruolo importante nella diagnosi di cancro gastrico, dal momento che aumenta la capacità di differenziare le lesioni gastriche di natura da determinare in benigne o maligne.^{39,40} Indubbiamente, essendo il carcinoma gastrico prevalentemente asintomatico nei suoi stadi più iniziali, l'esame citologico, così come accade per quello principale endoscopico-bioptico, verrebbe nella maggior parte dei casi eseguito in presenza di un tumore avanzato.⁴¹ Indipendentemente da questa limitazione, ciò che impedisce maggiormente di assegnare alla citologia un ruolo diagnostico di primo piano (data anche la semplicità, l'innocuità e la ripetibilità dell'esecuzione) è il fatto che la maggior parte delle ricerche citologiche condotte nel succo gastrico dei pazienti affetti da cancro gastrico dimostrano una scarsa percentuale di positività e, in misura minore, di falsa positività.⁴¹ Tra le varie casistiche note in letteratura, quella che raggiunge la percentuale più alta di positività (83,3%) è stata riportata da Palmer e Rubin nel 1953.^{39,42-44}

Esistono fondamentalmente **2 tecniche** di prelevamento del materiale gastrico sul quale deve essere eseguita l'indagine citologica: la prima è il **lavaggio** della cavità gastrica (**gastric**

lavage o gastric washing) (tramite sondino naso-gastrico o sonda gastroscopica), la seconda è la **brush cytology**.

Quanto alla prima, c'è uniformità nei lavori pubblicati nel lavaggiare la cavità gastrica con soluzione fisiologica (la quantità di soluzione fisiologica riportata nei diversi lavori varia da alcuni ml ai 500 ml) al fine di eliminare o diluire il muco che a sua volta disturba la successiva centrifugazione del succo gastrico.⁴¹⁻⁴⁴

La seconda tecnica, nota fin dagli anni '60, si è dimostrata capace, in alcuni lavori, di aumentare l'accuratezza diagnostica per il cancro gastrico quando combinata con il prelievo biotico.^{45,46} Anche per questa metodica esistono degli accorgimenti importanti da rispettare:

1. Il sito della campionatura dovrebbe essere accuratamente selezionato; qualora si tratti di un'ulcera, lo spazzolino prelevatore dovrebbe essere strisciato sui margini della stessa.
2. Dovrebbe essere utilizzata l'intera testa dello spazzolino.
3. Il brushing dovrebbe essere effettuato con una certa pressione in modo da includere le cellule tumorali che potrebbero essere coperte dal muco, tessuto necrotico o coaguli successivi alla biopsia.

4. Una volta che la campionatura del brushing è stata eseguita, particolare attenzione dovrebbe essere rivolta durante la retrazione dello spazzolino, in modo da non causare la perdita del materiale prelevato.⁴⁷

Anche questa metodica non è purtroppo risparmiata dai casi di falsa positività.⁴⁸⁻⁵⁰ Da menzionare è inoltre il lavoro di Cabre-Fiol e colleghi che nel 1975 hanno fatto diagnosi di leiomiosarcoma gastrico adoperando la brush cytology sotto visione diretta.⁵¹

Ai fini dell'analisi citopatologia del materiale gastrico, la colorazione degli strisci viene sempre eseguita secondo Papanicolau (vedi Materiali e Metodi per una descrizione più approfondita).³³

Da notare è che tutti i lavori citati in questo capitolo sulla citologia gastrica sono di almeno 20 anni fa; questo testimonia il progressivo abbandono della citologia gastrica da parte degli specialisti del settore in favore della gastroscopia associata alla biopsia, che senza dubbio rappresenta l'esame più affidabile e rapido da eseguire. Cionondimeno non deve essere dimenticato il ruolo tutt'altro che di nicchia che i suddetti lavori hanno conferito alla citologia gastrica.

Negli ultimi anni, inoltre, sembra essere rinato un certo nuovo interesse nei confronti della citologia diretta verso il carcinoma gastrico. Nel 2012, infatti, un lavoro polacco ha analizzato la citologia esfoliativa della mucosa orale in pazienti affetti da cancro gastrico e del colon: nessuna alterazione maligna, questa volta utilizzando il sistema di Bethesda, è stata ritrovata nei casi esaminati.^{52,53}

Il nostro gruppo di ricerca ha recentemente pubblicato 2 studi preliminari di interesse sul ruolo dell'analisi citopatologia del lavaggio gastrico nei pazienti affetti da adenocarcinoma dello stomaco e sul significato oncologico (clinico, prognostico e predittivo) della presenza di cellule cancerose in questo materiale biologico.^{54,55} I risultati ottenuti sono stati interessanti e hanno incoraggiato la prosecuzione di tale linea di ricerca i cui frutti sono illustrati in questa tesi (vedi qui di seguito).

7. OBIETTIVO DELLO STUDIO

In questo **studio osservazionale prospettico** abbiamo analizzato 80 pazienti affetti da adenocarcinoma gastrico ricoverati presso le unità operative complesse e dipartimentali di Chirurgia 1 e di Chirurgia d'Urgenza dell'Azienda Ospedaliera Sant'Andrea, Facoltà di Medicina e Psicologia, Università "Sapienza" di Roma, seguendoli in un follow-up massimo di 53 mesi (4 anni e 5 mesi) (follow-up medio per paziente pari a 17,11 mesi) al fine di valutare il significato oncologico dal punto di vista clinico, prognostico e/o predittivo dell'analisi citopatologica eseguita sul lavaggio gastrico. Quest'ultimo è stato effettuato a diagnosi già accertata all'inizio del momento chirurgico o durante il trattamento sintomatico e/o palliativo.

8. MATERIALI E METODI

Il nostro è uno **studio osservazionale** (*observational study*, detto anche *natural experiment*), **condotto in maniera prospettica** su 80 pazienti (45 maschi, 35 femmine, età media di 69,5875 anni, range tra i 39 e i 90 anni) affetti da adenocarcinoma dello stomaco ai quali è stato posizionato il sondino naso-gastrico all'inizio dell'intervento chirurgico (dopo il posizionamento e il cuffiaggio del tubo oro-tracheale) (71 casi, comprendenti sia quelli curativi sia palliativi sia solo esplorativi), all'inizio della dissezione endoscopica della sottomucosa (endoscopic submucosal dissection, ESD, 1 caso) o ai fini sintomatici-palliativi-nutrizionali (8 pazienti, in 2 dei quali il sondino è stato utilizzato come guida per poi posizionare una protesi) durante il ricovero nelle unità operative complesse e dipartimentali di Chirurgia Generale 1 e di Chirurgia d'Urgenza dell'Azienda Ospedaliera Sant'Andrea, Facoltà di Medicina e Psicologia, Università Sapienza di Roma, nell'intervallo di tempo compreso tra aprile 2012 e settembre 2016.

Degli 80 pazienti esaminati, 64 sono stati sottoposti ad intervento chirurgico di resezione gastrica per via laparotomica con finalità curativa (finalità R0) comprendente una linfadenectomia radicale

modificata D1.5 (e cioè linfadenectomia D1 con asportazione dei linfonodi del tripode celiaco e dell'arteria epatica comune). Di questi 64 interventi chirurgici, 30 sono state le gastrectomie totali, 30 le gastrectomie distali con ricostruzione gastrodigiunale alla Roux-en-Y e 4 le gastrectomie distali con ricostruzione alla Billroth II.

Una paziente affetta da early gastric cancer (EGC) è stata trattata con successo mediante ESD.

15 pazienti fortemente sintomatici affetti da carcinoma gastrico avanzato non sono stati sottoposti a chirurgia curativa; ai fini nutrizionali e palliativi, 7 di loro sono stati trattati con gastroenteroanastomosi (2 casi) o digiunostomia chirurgica secondo Wietzel (5 casi).

1 paziente (già gastrectomia in precedenza e ora con recidiva di malattia) è stato sottoposto a laparotomia esplorativa e, una volta accertata l'irresecabilità della lesione, a posizionamento di Port-a-cath ai fini oncologici.

7 pazienti sintomatici con carcinoma gastrico avanzato non sono stati sottoposti ad alcun trattamento chirurgico. Ai fini nutritivi, in 6 di loro è stato posizionato il sondino naso-digiunale; in uno lo stent esofageo.

Lo stadio della malattia è stato valutato secondo i parametri TNM della AJCC nella sua ultima versione del 2010.²²

8.1 Il lavaggio gastrico: procedura

In tutti gli 80 casi esaminati, la cavità gastrica è stata lavata (gastric lavage o gastric washing) con una quantità di soluzione fisiologica, sterile e a temperatura ambiente, pari o superiore a 500 ml in modo da ottenere una pari o superiore quantità di materiale biologico da analizzare.

Tale valore soglia è stato deciso sulla base anatomofisiologica del normale volume gastrico di una persona adulta sana, che sappiamo essere di circa 0,5 L se vuoto e arrivare a 1-1,5 L se completamente pieno, ad esempio dopo un pasto normale (fino a raggiungere, in particolari condizioni, una dilatazione maggiore di 4 L). Tale quantità ha quindi assicurato, almeno in teoria dato che lo stomaco dei pazienti al momento del campionamento era sempre necessariamente a digiuno, che tutte le superfici interne della parete gastrica venissero a contatto con il lavaggio permettendo quindi alle cellule (sia normali sia cancerose) di esfoliare (liberandole dal biofilm mucoso che normalmente riveste la parete gastrica interna) e riversarsi in esso.

La soluzione fisiologica è stata iniettata e riaspirata mediante siringhe coniche sterili da 60 ml connesse al sondino naso-gastrico. Ogni bolo da 60 ml è stato poi riversato e collezionato in un contenitore sterile da 500 ml.

Si è cercato di mantenere la **sterilità** nella procedura in modo da minimizzare il più possibile la contaminazione di batteri e ife fungine: tali contaminanti, infatti, sono capaci di creare tappeti che coprono le cellule cancerose rendendo il campione non idoneo all'analisi di citopatologia.

Le uniche due eccezioni al valore soglia di 500 ml per il lavaggio sono state costituite dalle neoplasie stenose del cardias (Siewert I, II e anche III) che risultano essere invalicabili al sondino e dalle neoplasie a carico dei monconi gastrici. Nel primo caso, infatti, a dover essere bagnato non è il lume gastrico ma la superficie prossimale della stenosi neoplastica. Nel secondo, la capacità del moncone gastrico vuoto è di sicuro inferiore a quella di uno stomaco intero vuoto rappresentandone circa la metà. Tuttavia, quando possibile, una quantità di 500 ml di soluzione è stata comunque adoperata; nei casi non idonei, è stata impiegata una quantità di almeno 250 ml.

Tutti i lavaggi sono stati effettuati dal medesimo operatore al fine di ridurre al minimo errori o difetti nella procedura di campionamento e/o trasporto (incluso il fattore temporale) all'U.O.D. di Citopatologia.

8.2 L'analisi citopatologica del lavaggio gastrico: procedura

Una volta pervenuto alla U.O.D. di Citopatologia, il campione è stato trattato, qualora particolarmente viscoso o ematico, rispettivamente con mucolitico (fissativo addizionato con acetilcisteina allo 0.2%) ed emolitico (fissativo con acido acetico al 10%) per una migliore rimozione dei fattori oscuranti l'analisi (rispettivamente muco e sangue). Il campione di lavaggio gastrico è stato quindi centrifugato mediante 2 cicli di 10 minuti ciascuno ad una velocità di 1500 giri per minuto. Con il sedimento sono stati allestiti dei vetrini che sono stati fissati mediante soluzione contenente acido picrico: questo mantiene inalterata la morfologia delle cellule (penetrandovi rapidamente), inattiva gli enzimi autolitici, annulla la carica batterica e permette infine alle cellule di aderire all'oggetto (vetrino). A seguito della fissazione, i vetrini sono stati trattati secondo la colorazione di Papanicolau.³³ Tale tecnica, pur prevedendo una lunga serie di passaggi, è in realtà rapida richiedendo circa 20 minuti. L'idratazione in passaggi successivi di acqua distillata e alcool etilico decrescente (80, 70 e 50%) prepara le cellule alla colorazione nucleare con l'Ematossilina di Harris, mentre la successiva disidratazione in passaggi di etanolo crescente (50, 70, 80 e infine 95%) le prepara

alle due colorazioni citoplasmatiche di Orange G ed EA50. Infine, l'ultima disidratazione in alcool etilico assoluto che elimina completamente l'acqua presente nelle cellule) e la chiarificazione in xilolo (che diafanizza le cellule) consentono al preparato di essere idoneo al passaggio del montaggio con il coprioggetto e quindi alla successiva lettura al microscopio ottico. Tutte le letture e analisi citopatologiche dei vetrini così ottenuti sono state condotte dai colleghi citopatologi della nostra azienda ospedaliera. I risultati sono stati classificati in 5 gruppi:

1. Presenza di cellule esfoliative normali
2. Modica deviazione della morfologia cellulare normale
3. Presenza di cellule anormali senza segni patognomonicici di malignità
4. Presenza di cellule atipiche
5. Presenza di cellule con segni patognomonicici di malignità e di cellule atipiche riunite in gruppi.

Il risultato di ogni gruppo è stato quindi espresso nei termini di negativo, sospetto o positivo: i reperti del primo e del secondo gruppo sono da considerare citologicamente negativi; quelli del terzo gruppo sospetti e quelli del quarto e quinto gruppo positivi.³³

I parametri presi in considerazione al fine di ottenere il giudizio summenzionato sono stati i seguenti:

1. Atipie nucleari (ipertrofia nucleare > 10-12 μ ; ipercromatismo nucleare; molteplicità e plurilobatura nucleare)
2. Mitosi (figure mitotiche abnormi e numerose)
3. Rapporto nucleo/citoplasma (aumentato)
4. Nucleoli (l'ipertrofia dei nucleoli è associato alla maggiore sintesi di RNA; la loro molteplicità può essere attribuita alla poliploidia)
5. Presenza di cromatina nucleare (distribuzione irregolare della cromatina che appare addensata in grossi ammassi granulari o in filamenti spessi)
6. Tipologia del citoplasma
7. Vacuolizzazioni citoplasmatiche (cellule ad anello con castone)
8. Dimensione cellulare (in genere aumentata)
9. Forma cellulare (polimorfismo)
10. Presenza di aggregati
11. Atteggiamento in pseudopapille o lembi degli elementi cellulari atipici

In 2 casi sospetti i vetrini sono stati ulteriormente analizzati mediante esame immunocitochimico utilizzando un anticorpo monoclonale anti-CEA (CEA clone 11-7 Dako®).

8.3 Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata condotta utilizzando il programma **MedCalc®** per Windows, **versione 16.8.4**, (MedCalc Statistical Software bvba, Ostend, Belgio, Copyright © 1993-2016, membro associato dell'American Statistical Association e dell'International Association of Statistical Computing).

Le associazioni tra le variabili sono state valutate tramite il test parametrico dell'analisi della varianza (ANOVA a una via o ANOVA a due vie) o mediante il test non parametrico del chi quadrato di Pearson (test della bontà dell'adattamento).

Nell'eleggere la presenza di cellule neoplastiche nel lavaggio gastrico come fattore di rischio di aggressività tumorale, per il confronto delle frequenze di comparsa di un evento (ad esempio, dell'evento morte o sopravvivenza) tra i soggetti con o senza tale fattore di rischio è stato previsto il calcolo del rischio relativo (RR).

Per la valutazione della sopravvivenza, il metodo di Kaplan-Meier associato al test dei ranghi logaritmici (log-rank test) è stato utilizzato ai fini del calcolo e della rappresentazione

grafica, mentre l'analisi della regressione multipla è stata effettuata mediante il modello a rischi proporzionali di Cox.

Nella fattispecie, i tipi di sopravvivenza presi in esame sono stati 4:

- 1) **Sopravvivenza globale (overall survival, OS)** intendendo l'intervallo di tempo trascorso fra il giorno della campionatura del materiale biologico in esame e la stesura della presente tesi (dicembre 2016), includendo i pazienti sia vivi (sia liberi da malattia sia con malattia) sia deceduti per qualsiasi causa.
- 2) **Sopravvivenza libera da progressione di malattia (progression-free survival, PFS)** ossia il tempo trascorso dal giorno della campionatura alla progressione metastatica (escludendo quindi quella locale o regionale) o alla morte avvenuta per qualsiasi causa (neoplastica e non neoplastica).
- 3) **Sopravvivenza libera da malattia (disease-free survival, DFS, detta anche recurrence-free survival, RFS)** che include il tempo trascorso tra la campionatura e qualsiasi recidiva (locale o regionale) o metastasi a distanza, come anche il decesso per qualsiasi causa.

4) **Tempo di progressione di malattia (o tempo mediano alla progressione) (time to progression oppure time to tumor progression, TTP)**, che differisce dalla PFS soltanto nelle cause di morte dato che debbono essere specificamente connesse alla progressione di malattia.

I valori di p inferiori a 0.05 ($p < 0.05$) sono stati utilizzati come valore soglia (cut-off) per la significatività statistica dei vari test summenzionati.

9. RISULTATI

Degli 80 pazienti esaminati per adenocarcinoma gastrico, 45 erano maschi (56.25%) e 35 femmine (43.75%). L'età media è stata pari a 69,5875 anni, con un range tra i 39 e i 90 anni.

In 39 casi (48.75%) la neoplasia era localizzata nella regione gastrica antro-pilorica, in 23 casi (28.75%) in quella cardiale, e in 10 casi in quella corpo-fundica; a quest'ultima vanno aggiunti 8 casi di carcinoma insorto su moncone gastrico corpo-fundico (4 monconi B2, 3 monconi Roux-en-Y e 1 moncone B1) in seguito a pregresso intervento resettivo condotto in 4 casi per ulcera peptica e in 4 casi per cancro gastrico.

Nelle tabelle sottostanti sono riportate le caratteristiche clinico-patologiche degli 80 casi esaminati di adenocarcinoma gastrico (Tabelle 1-9).

Tabella 1

Sesso	
M	45 (56.25%)
F	35 (43.75%)
Età	
<60 anni	21 (26.25%)
≥60 anni	59 (73.75%)
Sede del T	
Antro-piloro	39 (48.75%)
Cardias-fondo-monconi	36 (45%)
Corpo	5 (6.25%)
Differenziazione	
G1	8 (10%)
G2	10 (12.5%)
G3	52 (65%)
G4	10 (12.5%)
Classificazione sec. Lauren	
Intestinale	51 (63.75%)
Diffuso	26 (32.5%)
Misto	3 (3.75%)
Cellule ad anello con castone	20 (25%)

Tabella 2

<i>Classificazione per T secondo AJCC 2010</i>	
T1a	5 (6.25%)
T1b	8 (10%)
T2	12 (15%)
T3	26 (32.5%)
T4a	14 (17.5%)
T4b	15 (18.75%)

Tabella 3

<i>Classificazione per N secondo AJCC 2010</i>	
N0	20 (25%)
N1	18 (22.5%)
N2	12 (15%)
N3a	15 (18.75%)
N3b	15 (18.75%)

Tabella 4

<i>Classificazione per M secondo AJCC 2010</i>	
M0	62 (77.5%)
M1	18 (22.5%)

Tabella 5

<i>Stadiazione secondo AJCC 2010</i>	
1A	11 (13.75%)
1B	8 (10%)
2A	3 (3.75%)
2B	11 (13.75%)
3A	7 (8.75%)
3B	14 (17.5%)
3C	8 (13.75%)
4	18 (22.5%)

Tabella 6

<i>Presenza di invasione linfo-vascolare all'esame istologico (valutabile – valutata in 64 casi)</i>	
LV0	32 (50%)
LV1	32 (50%)

Tabella 7

<i>Presenza di invasione perineurale all'esame istologico (valutabile – valutata in 64 casi)</i>	
<i>Pn0</i>	<i>45 (70.3%)</i>
<i>Pn1</i>	<i>19 (29.7%)</i>

Tabella 8

<i>R0 vs R1 (margini chirurgici di resezione gastrica) (escludendo gli interventi palliativi)</i>	
<i>R0</i>	<i>57 (89%)</i>
<i>R1</i>	<i>7 (11%)</i>

Tabella 9

<i>Ratio dei linfonodi metastatici (LNR, NR, MLR) (valutabile – valutata in 64 casi)</i>	
<i>MLR 0 (0)</i>	<i>20 (31.25%)</i>
<i>MLR 1 (>0-0.3)</i>	<i>19 (29.68%)</i>
<i>MLR 2 (>0.3-0.6)</i>	<i>17 (26.56%)</i>
<i>MLR 3 (>0.6)</i>	<i>8 (12.5%)</i>

9.1 *Trattamento neoadiuvante, adiuvante, palliativo*

Degli 80 pazienti, 17 (21.25%) sono stati trattati con *trattamento neoadiuvante* che è consistito nella chemioterapia in 14 casi (schemi più utilizzati: EOX, ECF e DCF) e in chemio-radioterapia (in genere 5-FU come agente chemioterapico) combinata in 3 casi.

Il *trattamento adiuvante* è stato somministrato in 52 casi (65%): di questi, 23 pazienti sono stati trattati con chemio-radioterapia combinata, 17 con chemioterapia adiuvante e 12 con radioterapia adiuvante. Una dose radiante complessiva di 50,4 Gy è stata in genere effettuata sul letto gastrico e sui linfonodi loco-regionali.

Un trattamento oncologico palliativo è stato effettuato in 6 pazienti (7.5%) per i quali non è stato programmato alcun altro presidio se non il sondino naso-gastrico per la decompressione o il sondino naso-digiunale per la nutrizione enterale: di questi, 3 pazienti hanno ricevuto chemio-radioterapia e altri 3 pazienti la sola chemioterapia.

I 2 pazienti trattati con gastroenteroanastomosi palliativa, i 5 trattati con digiunostomia chirurgica palliativa e 2 pazienti già gastrosiectati con ritorno di malattia (sottoposti l'uno a laparotomia esplorativa e l'altro a impianto di protesi esofagea) non sono riusciti ad iniziare il trattamento oncologico palliativo o per la sopraggiunta di exitus o perché con una performance status così scaduta da non giustificare neppure una palliazione terapeutica in senso oncologico.

9.2 *L'analisi citopatologica del lavaggio gastrico*

Degli 80 pazienti esaminati, in 36 casi (45%) è stata dimostrata la presenza di cellule neoplastiche nel lavaggio gastrico (designata con l'acronimo **GL1** mentre **GL0** sta ad identificarne l'assenza, Tabella 10).

Tabella 10

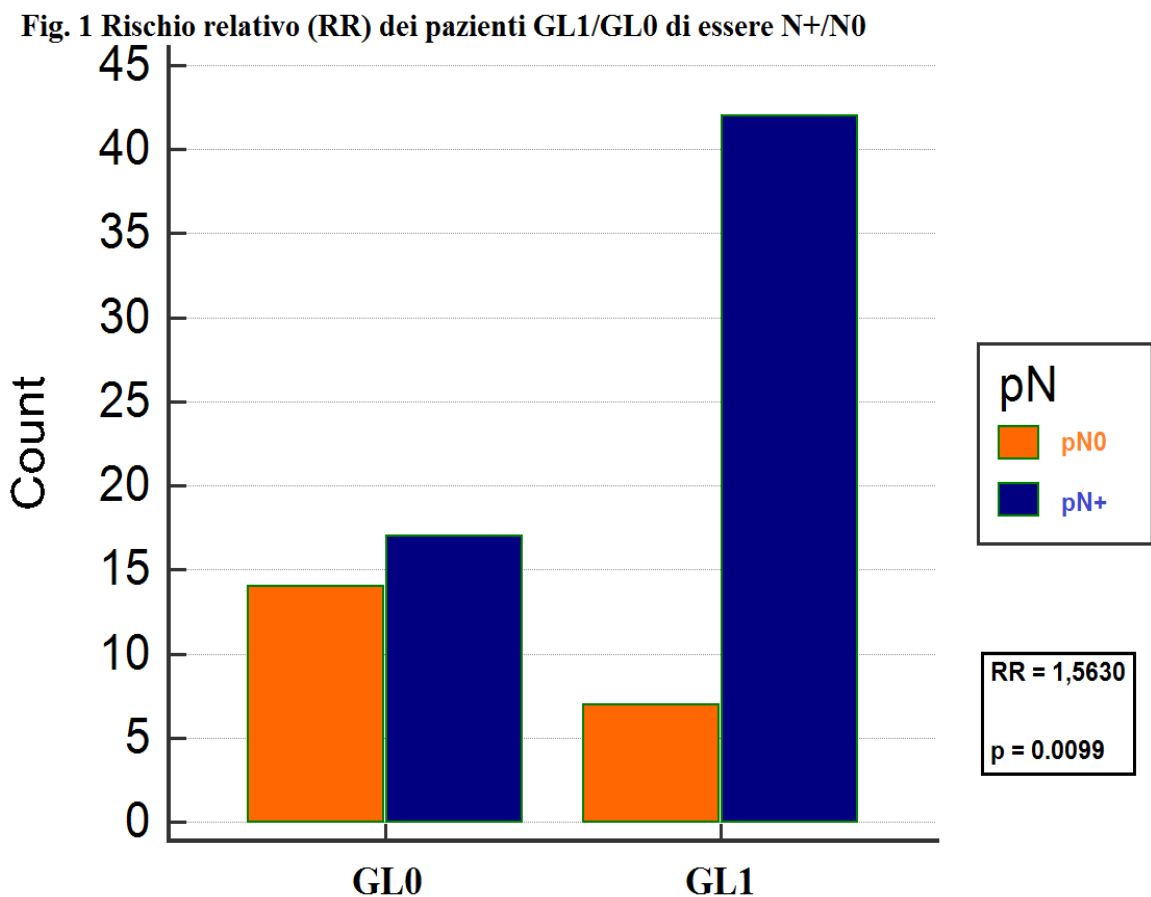
<i>Presenza di cellule cancerose nel lavaggio gastrico</i>	
GL0	44 (55%)
GL1	36 (45%)

Al test del chi quadrato, **GL1** è risultato associarsi in maniera statisticamente significativa agli altri parametri classificativi del tumore avanzato ossia del T (nei **T3-T4** versus T1-T2, $p=0.0317$), dell' N (in presenza di metastasi linfonodali loco-regionali **N+** vs **N0**, $p=0.0024$) e delle metastasi (anche linfonodali) a distanza (**M1** vs **M0**, $p=0.0030$) come evidenziato nella Tabella 11.

Traducendo in numeri, 41 dei 56 pazienti T3-T4 aveva GL1 (73.21%); dei 23 pazienti T1T2, 11 avevano GL1. 42 dei 59 pazienti

N+ avevano GL1 (71.18%), mentre dei 21 pazienti N0, 7 avevano GL1. Dei 18 pazienti M1, 15 avevano una citologia gastrica positiva (83.3%).

Quanto al parametro N, rispetto ai pazienti GL0, i pazienti GL1 hanno mostrato un rischio relativo (**RR**) di avere N+ dell'1.5630 con un livello di p statisticamente significativo ($p=0.0099$); ciò significa, in altre parole, che la probabilità attesa di essere N+ per un paziente GL1 (come anche quella per un paziente GL0 di essere N0) è sia maggiore di uno sia altamente significativa dal punto di vista statistico (Fig. 1). Questo outcome è mancato, seppur di poco, nei confronti della classificazione T3T4 (RR di 1.4192 con $p=0.0605$).



Di interesse, anche l'associazione con l'invasione linfovascolare (**LV1** vs LV0) ha superato la soglia della significatività statistica ($p=0.0028$, Tabella 11).

Il GL1 ha mostrato anche una certa tendenza ad affiancarsi all'invasione neoplastica perineurale (Pn1 vs Pn0) senza tuttavia raggiungere un p significativo ($p=0.0850$) (Tabella 11). Globalmente, la correlazione tra GL1/GL0 e il margine chirurgico (R1/R0) non è risultata statisticamente significativa ($p=0.2569$). Dei 7 casi trattati con resezione gastrica risultati essere R1, 2 (28.57%) avevano una citologia positiva (Tabella 11).

Neppure la correlazione con gli altri parametri clinico-patologici di classificazione, stadiazione e prognosi (ossia sesso, età, differenziazione, tipo istologico secondo Lauren, stadio, presenza di cellule ad anello con castone) ha raggiunto un significato statistico (Tabella 11).

Tabella 11 *Correlazione mediante test del chi quadrato della citologia positiva per cellule neoplastiche (GL1) con gli attuali parametri classificativi, stadiativi e prognostici.*

Sesso	p 0.7975
Età	p 0.3843
T3-T4 vs T1-T2	p 0.0317
N+ vs N0	p 0.0024
G3-G4 vs G1-G2	p 0.4989
LV1 vs LV0	p 0.0028
<i>Pn1</i> vs <i>Pn0</i>	<i>p 0.0850</i>
M1 vs M0	p 0.0030
Stadi III-IV- vs Stadi I-II	p 0.2273
Classificazione secondo Lauren (Ca intestinale vs diffuso)	p 0.8288
Presenza vs assenza di cellule ad anello con castone	p 0.3678
R1 vs R0	p 0.2569

9.3 La sopravvivenza nei pazienti GL1 vs GL0: analisi con il metodo di Kaplan-Meier

Ad un follow-up complessivo di 53 mesi (4 anni e 5 mesi), il tasso di sopravvivenza globale (overall survival, OS) si è attestato ad una media di 23 mesi per i pazienti con citologia positiva (GL1) e a 42 mesi per quelli con citologia negativa (GL0) e tale dato ha raggiunto una valenza prognostica sicura e significativa ai fini statistici allo stimatore di Kaplan-Meier ($p=0,0005$) (Fig. 1a). Di interesse, il fattore GL1 vs GL0 ha mostrato una significatività statistica anche per gli endpoints della PFS (22,8 vs 42,4 mesi con $p=0.0002$) (Fig. 1b), TTP (17,8 vs 30,5 mesi con $p=0.0210$) (Fig. 1c) e DFS (26,5 vs 42,4 mesi con $p=0.0012$ alla curva di Kaplan-Meier) (Fig. 1d).

Degli 80 pazienti, al termine del suddetto follow-up si sono registrati 51 decessi, tutti dovuti a malattia neoplastica (recidivante o metastatica) tranne 4 casi verificatisi per complicanze postoperatorie: in 27 casi i pazienti sono stati uomini, in 24 casi donne. Dei 27 uomini, 14 avevano GL1 (51.85%); delle 24 donne, 11 sono risultate avere GL1 (45.83%). In totale, quindi, il 49% dei pazienti deceduti (25 casi) ha avuto una citologia gastrica positiva.

Fig. 1a

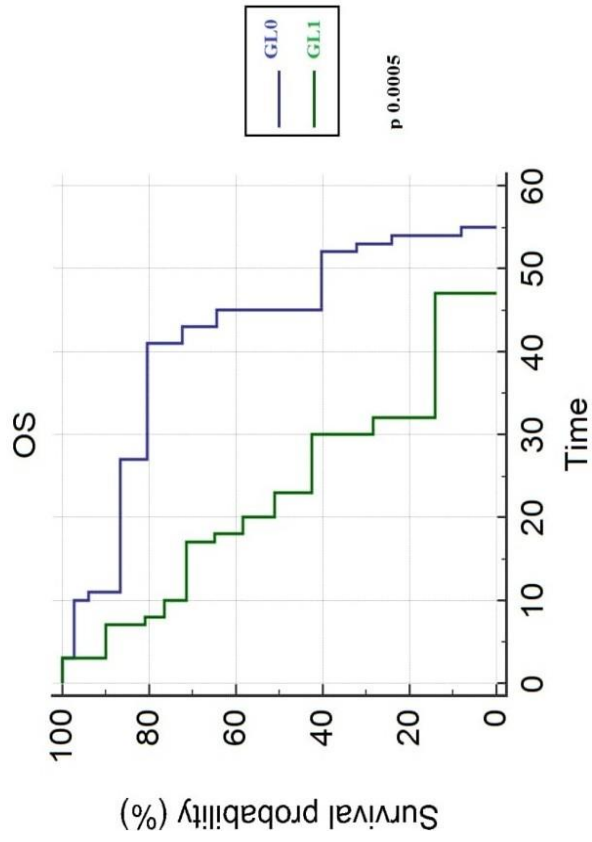
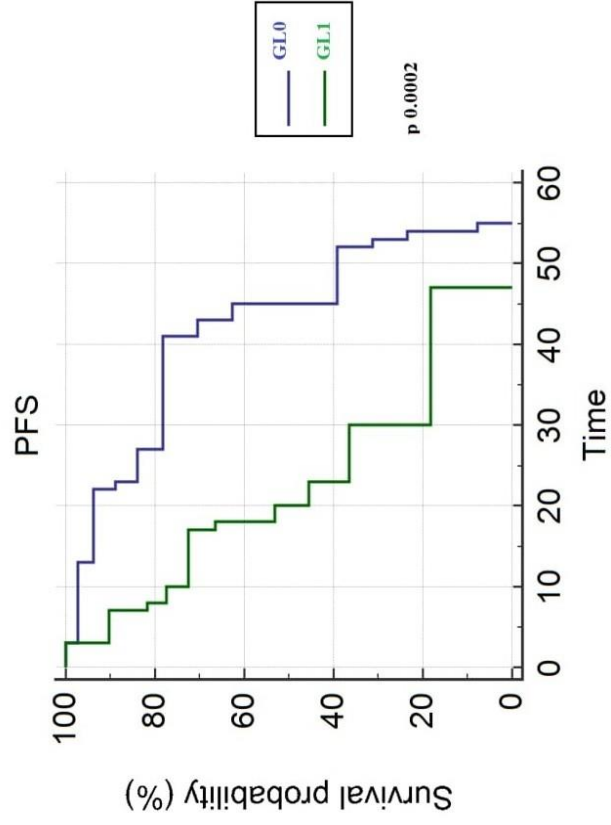


Fig. 1b



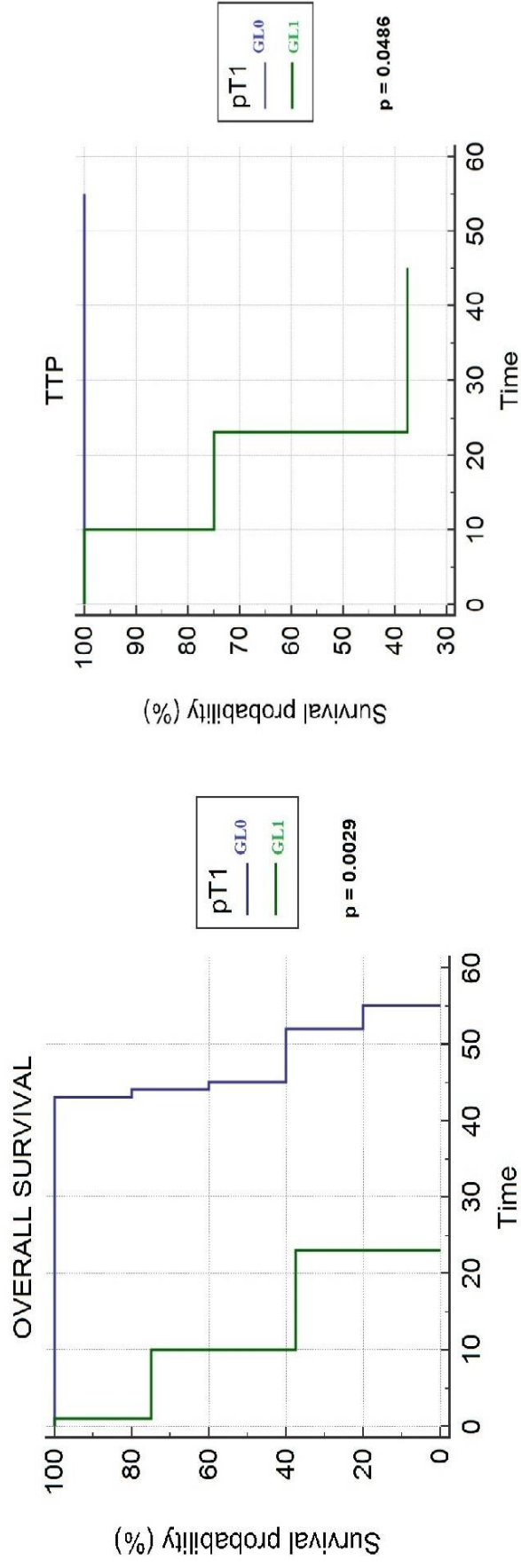
Nell'analisi per sottogruppi, la sopravvivenza globale (OS) nei pazienti T3T4 con GL1 e T3T4 con GL0 è stata in media di, rispettivamente, 32 e 41,7 mesi: tuttavia il dato prognostico non ha acquisito una sufficiente validità statistica ($p=0,1571$).

Similmente, in relazione alle classificazioni di T2, T3 e T4 (presi singolarmente) il fattore GL1 vs GL0 non ha mostrato una OS significativa (rispettivamente, 12,5 mesi vs 29 mesi con $p=0.1123$ per i T2, 27,8 vs 53,6 mesi con $p=0.1385$ per i pT3 e 23 vs 41 mesi con $p=0.5594$ per i T4).

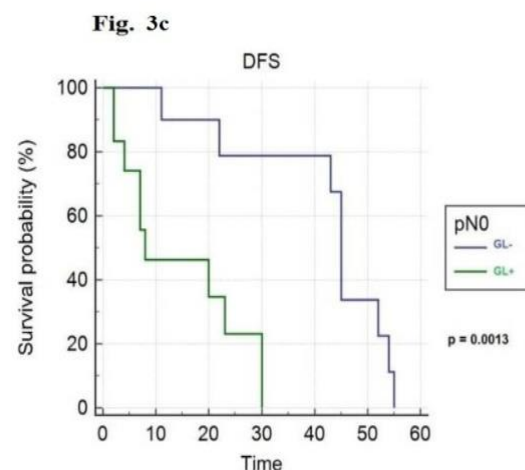
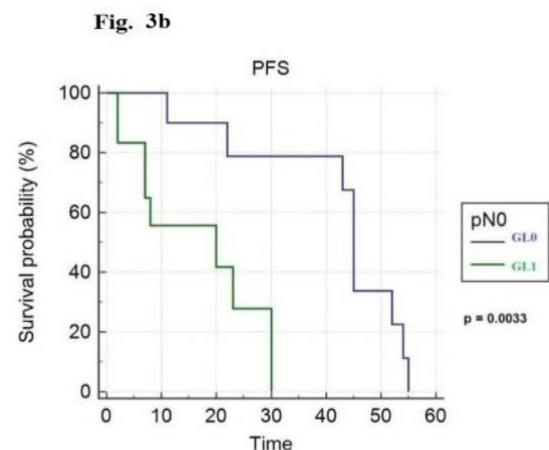
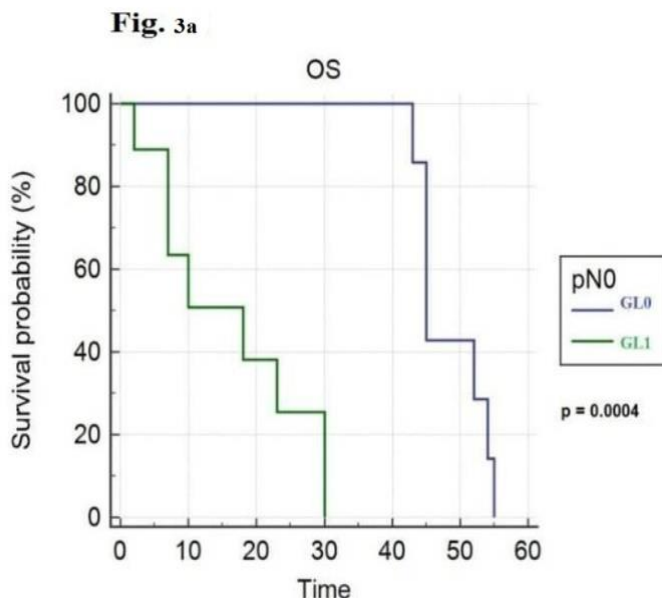
Di contro, **nei pazienti T1** la presenza vs assenza di cellule cancerose nel lavaggio gastrico ha inciso significativamente sulla OS (12,6 vs 47,8 mesi, $p=0.0029$) (Fig. 2a), PFS (8 vs 46,6 mesi, $p=0.0015$) (Fig. 2b), TTP (28 vs 55 mesi, $p=0.0486$) (Fig. 2c), DFS (12 vs 47 mesi, $p=0.0115$) (Fig. 2d).

La sopravvivenza globale media (OS) dei pazienti N+ con citologia positiva rispetto a quelli N+ con citologia negativa è stata di 12,4 mesi versus 17,5 mesi: neppure in questo caso, tuttavia, il dato ha trovato un potere statisticamente significativo ($p=0.3064$). Come la OS

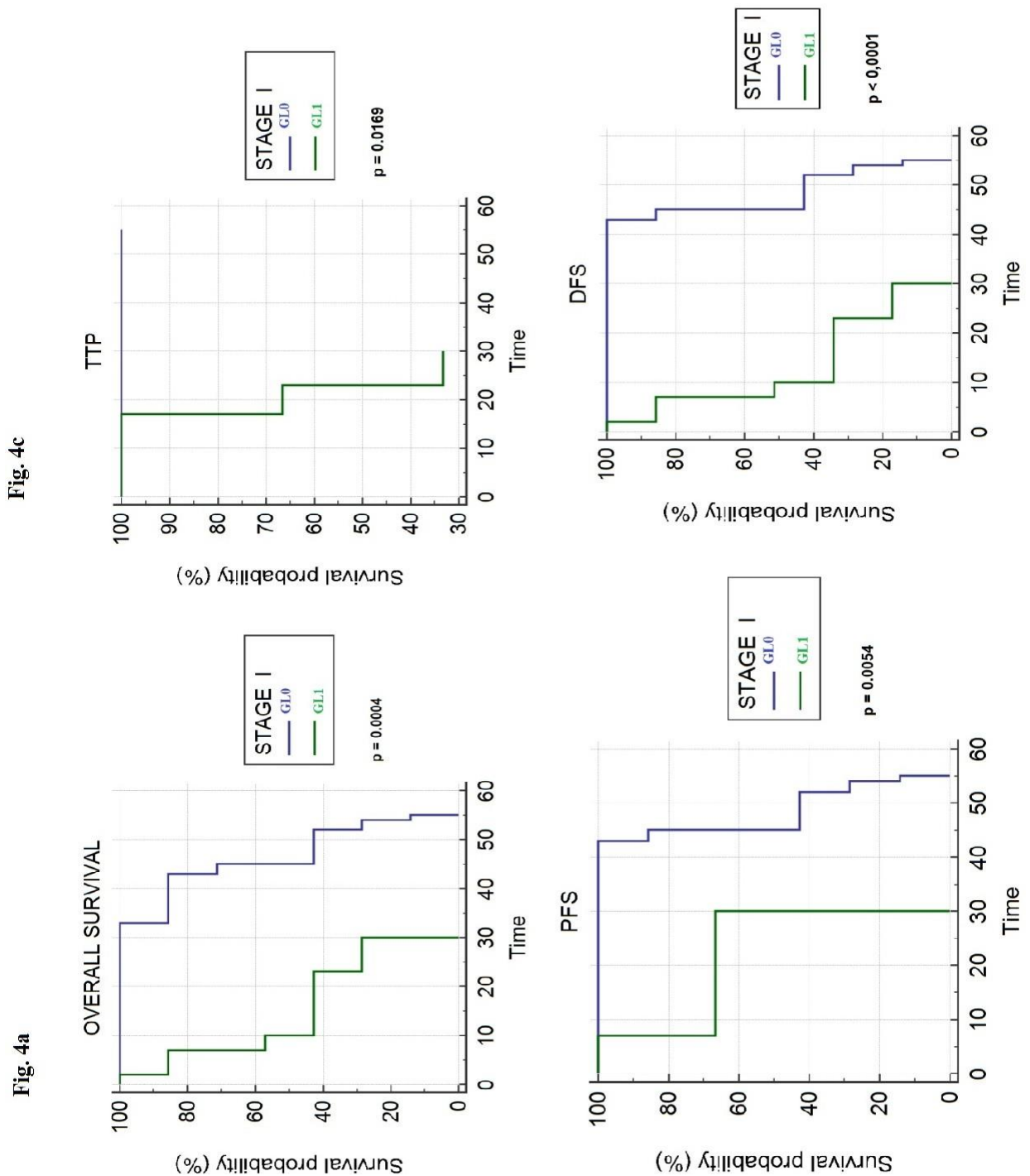
Fig. 2c



Nei pazienti N0, diversamente dai pazienti N+, GL1 ha mostrato un peso statistico influente: infatti l'OS media è risultata pari a 16,1 mesi nei pazienti GL1 e di 48,4 mesi in quelli GL0 ($p=0.0004$, Fig. 2a). Similmente, anche la PFS e la DFS hanno raggiunto un livello di significatività statistica accettabile (PFS: 16,6 mesi nei pazienti GL1 vs 41,7 mesi in quelli GL0 con $p=0.0033$, Fig. 2b) (DFS: 14,6 mesi nei pazienti GL1 vs 41,7 mesi nei pazienti GL0 con $p=0.0013$, Fig. 2c), mentre il TTP non ha raggiunto un sufficiente livello di significatività (24,8 mesi nei pazienti GL1 rispetto ai 50,8 mesi dei pazienti GL0, $p=0.1812$).



Quanto allo staging, nei **pazienti con stadio I** GL1 vs GL0 ha determinato una differenza statisticamente significativa in termini di OS (15,5 vs 46,7 mesi, $p=0.0004$) (Fig. 4a), PFS (22,3 vs 48,4 mesi, $p=0.0054$) (Fig. 4b), TTP (23,3 vs 55 mesi, $p=0.0169$) (Fig. 4c) e anche DFS (13,4 vs 48,4 mesi, $p<0.0001$) (Fig. 4d).



Nei 17 pazienti sottoposti a trattamento neoadiuvante, il parametro GL non ha determinato una differenza statisticamente significativa tra quelli GL1 e GL0 né in termini di OS ($p=0.3679$, con 25 mesi in quelli GL1 e 36 mesi in quelli GL0) né di TTP ($p=0.6678$, con 17 mesi in quelli GL1 e 18 mesi in quelli GL0).

Dei 29 pazienti ancora in vita a dicembre 2016, 2 hanno sviluppato una recidiva anastomotica inoperabile per cui stanno eseguendo chemioterapia: entrambi i casi erano GL1. Due pazienti hanno sviluppato altri tumori: una paziente GL0 ha sviluppato un sarcoma dell'arto inferiore e, dopo l'opportuno trattamento, versa in ottime condizioni di salute; l'altra paziente, che aveva avuto un esame istologico gastrico pT1a pN0 G2 Stadio IA GL1, ha sviluppato dopo 5 mesi dall'intervento di gastrectomia distale un carcinoma duttale infiltrante a carico della mammella destra trattato con quadrantectomia e radioterapia: sta attualmente assumendo ormonoterapia. Altri due pazienti, entrambi con tumore gastrico localmente avanzato GL1, stanno terminando il trattamento adiuvante chemio-radioterapico combinato mentre un'altra paziente GL0 sta ultimando la CT adiuvante.

9.4 La sopravvivenza nei pazienti GL1 vs GL0: analisi (della varianza) univariata

Il modello univariato ha rivelato come **GL1** si sia associato in maniera statisticamente significativa all'OS ($p=0.005$ per ANOVA a una via e $p=0.001$ per ANOVA a 2 vie), PFS ($p=0.001$ per ANOVA sia a 1 che a 2 vie), TTP ($p=0.005$ per ANOVA a una via ma con p non significativo per ANOVA a 2 vie ossia 0.0671) e DFS ($p=0.003$ per ANOVA a una via e $p<0.001$ per ANOVA a 2 vie) (Tabella 12).

Oltre al parametro GL, si sono significativamente associati a OS anche **LV** ($p=0.010$ per ANOVA a una via ma con $p=0.583$ per ANOVA a 2 vie), **M** ($p=0.007$ per ANOVA a 1 via mentre l'ANOVA a 2 vie non era possibile da valutare), **N** ($p=0.002$ per ANOVA a 1 via ma con $p=0.117$ per quella a 2 vie), **Pn** ($p=0.022$ per quella a 1 via ma con $p=0.549$ per quella a 2 vie), **Stadio** ($p=0.012$ per modello a una via mentre la p non era valutabile per quello a due vie). Di contro, il grading istologico ($p=0.395$ per l'ANOVA a una via e $p=0.683$ per quella a 2 vie), la ratio dei linfonodi metastatici ($p=0.982$ per ANOVA a 1 via e p non valutabile per quella a due vie), i margini di resezione chirurgica ($p=0.119$ per ANOVA a 1 via e $p=0.947$ per quella a 2 vie) e il T ($p=0.053$ per ANOVA a 1 via e $p=0.954$ per ANOVA a due vie) hanno mancato tale risultato (Tabella 12).

Tabella 12 Analisi uni variata di GL come fattore prognostico per OS, PFS, TTP e DFS (ANOVA a una via)

GL per OS	p = 0.005
GL per PFS	p = 0.001
GL per TTP	p = 0.005
GL per DFS	p = 0.003

Tabella 13 Analisi univariata dei fattori prognostici per OS (ANOVA a una via)

GL	p = 0.005
N	p = 0.002
M	p = 0.007
LV	p = 0.010
Pn	p = 0.022
Stadio	p = 0.012

Sempre all'analisi univariata, il parametro **T** è risultato l'unico, oltre a quello **GL**, ad associarsi in maniera statisticamente significativa al TTP medio (p=0.012 per ANOVA a una via ma con p=0.765 in quello a 2 vie) (G con p=0.839 per l'ANOVA a una via e p=0.870 per l'ANOVA a 2 vie, LNR con p=0.471 per l'ANOVA a 1 via e p non valutabile in quello a 2

vie, LV con $p=0.510$ nell'ANOVA a 1 via e $p=0.431$ in quella a 2 vie, M con $p=0.679$ e $p=0.659$, N con $p=0.092$ e $p=0.806$, Pn con $p=0.366$ e p non valutabile in quella a 2 vie, R con $p=0.449$ e $p=0.896$, stadio con $p=0.321$ e $p=0.730$).

Nel sottogruppo dei pazienti N0, GL1 versus GL0 si è associato con significatività statistica a OS (nell'ANOVA a 1 via con $p=0.002$), PFS ($p=0.003$), TTP ($p=0.009$) e DFS ($p=0.003$).

9.5 La sopravvivenza nei pazienti GL1 vs GL0: analisi multivariata

All'analisi multivariata, **GL** è stato identificato come **l'unico fattore prognostico indipendente sia per l'OS (p=0.0013) sia per la PFS (p=0.0107)**. Per la DFS, GL è risultato l'unica covariata indipendente statisticamente significativa (p=0.0038), ma ha mancato di evidenza significativa nella relazione del modello globale comprendente tutte le covariate con DFS (p=0.0630). Quanto al TTP, l'analisi non ha identificato nessun fattore prognostico indipendente (Tabelle 14, 15, 16).

Tabella 14 Analisi multivariata dei fattori prognostici per OS

Overall Model Fit: Significance level: P = 0.0443						
Independent variables	b	SE	Wald	P	Exp(b)	95% CI of Exp(b)
GL	1,5951	0,4960	10,3421	0,0013	4,9286	1,8644 to 13,0292
T	-0,8909	0,5003	3,1710	0,0750	0,4103	0,1539 to 1,0938
N	-0,8694	0,7382	1,3871	0,2389	0,4192	0,0986 to 1,7815
LV	0,6548	0,5361	1,4918	0,2219	1,9247	0,6730 to 5,5042
Pn	-1,3907	1,1234	1,5326	0,2157	0,2489	0,0275 to 2,2503
STAGE	1,3917	0,8111	2,9442	0,0862	4,0217	0,8204 to 19,7159
LNR	0,3072	0,8467	0,1316	0,7168	1,3596	0,2586 to 7,1470
G	0,2400	0,4632	0,2684	0,6044	1,2712	0,5128 to 3,1514
R	0,02897	1,2533	0,0005344	0,9816	1,0294	0,0883 to 12,0055
M	- 10,1530	215,3217	0,002223	0,9624	0,0000	2,01878E-188 to 75,19087E+177

Tabella 15 Analisi multivariata dei fattori prognostici per PFS

Overall Model Fit: Significance level: P = 0.0127						
Independent variables	b	SE	Wald	P	Exp(b)	95% CI of Exp(b)
GL	1,6421	0,4876	10,0356	0,0107	4,5487	1,6724 to 13,921
T	-0,5419	0,4886	3,1710	0,0950	0,7503	0,1623 to 1,1054
N	-0,8694	0,7244	1,3717	0,1428	0,3682	0,1034 to 1,8712
LV	0,6548	0,5287	1,5022	0,5289	1,7523	0,6623 to 5,4939
Pn	-1,3907	1,1234	1,5226	0,2157	0,2489	0,0280 to 2,2492
STAGE	1,4081	0,791	2,8482	0,1062	3,7217	0,8155 to 18,961
LNR	0,2932	0,8007	0,1657	0,7168	1,3596	0,2477 to 7,0969
G	0,2580	0,4286	0,2684	0,6044	1,2712	0,4933 to 2,9023
R	0,0307	1,1955	0,000523	0,9816	1,0294	0,183 to 12,0055
M	-9,1478	224,7344	0,002356	0,9624	0,0000	1,90878E-185 to 74,99087E+165

Tabella 16 Analisi multivariata dei fattori prognostici per DFS

Overall Model Fit: Significance level: P = 0.0630 (non significativo)						
Covariate	b	SE	Wald	P	Exp(b)	95% CI of Exp(b)
GL	1,4561	0,5025	8,3950	0,0038	4,2890	1,6017 to 11,4850
T	-0,9021	0,5007	3,2455	0,0716	0,4057	0,1521 to 1,0826
N	-0,7293	0,7432	0,9629	0,3265	0,4823	0,1124 to 2,0697
LV	0,4912	0,5430	0,8183	0,3657	1,6343	0,5638 to 4,7377
Pn	-13,2325	240,7704	0,003021	0,9562	0,0000	2,01974E-211 to 15,88848E+198
STAGE	1,3229	0,8188	2,6104	0,1062	3,7544	0,7543 to 18,6860
LNR	0,2832	0,8584	0,1088	0,7415	1,3273	0,2468 to 7,1390
G	0,1809	0,4674	0,1497	0,6988	1,1983	0,4794 to 2,9952
R	0,1739	1,3263	0,01719	0,8957	1,1899	0,0884 to 16,0132
M	-0,3470	638,6928	0,0000002952	0,9996	0,7068	0,0000 to 10,14231E+303

10. DISCUSSIONE

Il nostro studio nasce da almeno due riflessioni che vogliamo illustrare qui di seguito:

1. Nonostante il suo contributo (noto in letteratura) alla diagnosi microscopica di carcinoma quando effettuata nella cavità gastrica (o per washing o per brushing) in combinazione con la gastroscopia e prelievo bioptico istologico come pure alla determinazione della presenza di malattia metastatica quando eseguita nel lavaggio peritoneale, la citologia eseguita a livello gastrico in presenza di carcinoma gastrico non è finora stata studiata al fine di scoprirne un possibile ruolo nella stadiazione e nella prognosi per i pazienti affetti da questo tipo di tumore.^{62-72 39,40,42-50} Il nostro gruppo di ricerca è stato il primo ad indagare tale campo di ricerca: i risultati iniziali sono stati interessanti e ci hanno spinto a continuare questa condotta.^{54,55}
2. Nonostante i progressi fatti negli ultimi decenni in campo diagnostico e terapeutico per l'adenocarcinoma dello stomaco, non sempre i criteri clinico-stadiativi attualmente condivisi riescono a prevedere esattamente quella che sarà poi la reale storia naturale della neoplasia per un dato paziente, al di là dei grandi numeri statistici.

Molte volte, infatti, a parità di stadio, di età, di trattamento e di tutte le altre caratteristiche clinico-patologiche già note, due stessi pazienti mostrano avere un destino differente nel corso del tempo. Questo dimostra, come già avanzato da molti altri, come i parametri clinici e stadiali correnti (come quelli presi riprodotti nell'AJCC 2010, 7a edizione) non siano perfetti o, comunque, siano incompleti mancando di considerare per esempio altri criteri come la ratio dei linfonodi metastatici (LNR, MLR o N ratio) o le terapie eseguite (neoadiuvanti o adiuvanti).

In questa ottica, per questo tumore abbiamo voluto riconsiderare, ampliandone lo spettro di ricerca, un materiale biologico che aveva destato interesse e riscontrato un certo successo specialmente negli anni passati, ma che poi è andato incontro all'abbandono da parte della comunità scientifica per l'esiguità dei risultati ottenuti: **il lavaggio gastrico (gastric lavage, gastric washing, GL, GW).**

Attualmente il lavaggio gastrico conserva un ruolo certo nel trattamento delle emergenze da avvelenamenti e intossicazioni orali ed una indicazione, se non certa di sicuro storica, in quello delle emorragie acute digestive superiori.^{57,58} Recentemente, inoltre, è stato associato ad una minore incidenza di emorragie digestive superiori se effettuato prima delle resezioni endoscopiche sottomucose (ESD) delle neoplasie gastriche iniziali.⁵⁹ Ancora

dibattuto è invece il suo beneficio per l'alimentazione nei neonati venuti al mondo con il liquido amniotico tinto di meconio.⁶⁰ Sempre a livello pediatrico, infine, nei paesi in via di sviluppo è considerato una procedura altamente utile (ossia altamente sensibile e specifica) alla diagnosi di tubercolosi polmonare nei pazienti che non producono espettorato.^{61,62}

Venendo a noi, per quanto riguarda i pazienti affetti da adenocarcinoma dello stomaco, negli anni passati il lavaggio gastrico veniva analizzato a livello citologico solo a fini diagnostici per poi venire abbandonato e sostituito, tranne in rari casi selezionati, dalla combinazione dell'esame endoscopico con la biopsia (procedura assai più sensibile e specifica per quanto riguarda appunto la diagnosi). Oggigiorno, infatti, come testimoniato dalla letteratura scientifica, l'analisi citologica gastrica viene eseguita soltanto in comunione con l'esame endoscopico e bioptico al fine di aumentarne sensibilmente la capacità diagnostica (specialmente in caso di piccoli tumori sottoangolari, difficili da bioptizzare), o anche, sempre con il "solo" intento diagnostico, in caso di patologie gastriche rare.^{39,40,51} In questo studio, invece, abbiamo cercato di "elevare" il fine dell'esame citopatologico del lavaggio gastrico: infatti, ricercando la presenza o l'assenza di cellule cancerose, esso è stato condotto non per la diagnosi ma con

scopo di indagine clinico-oncologica (tramite la correlazione con gli attuali parametri classificativi, stadiativi e prognostici) al fine di scoprire, capire, spiegare, pubblicizzare e utilizzare le nuove informazioni pato-biologiche (inerenti il comportamento spesso imprevedibile di questa neoplasia) provenienti da questa analisi.

Nel nostro studio sono presenti dei **punti forti** come pure alcune **limitazioni**.

Tra i primi annoveriamo:

- 1) *la tipologia prospettica dello studio* che ha permesso una raccolta precisa dei dati e delle caratteristiche dei pazienti a fronte degli studi retrospettivi nei quali spesso tali informazioni non sono ben note o dichiarate, inficiando, pertanto, probabilmente sulla correttezza dei risultati ottenuti.
- 2) Il campionamento del lavaggio gastrico e il suo trasporto presso il servizio di citopatologia sono stati eseguiti *sempre da un unico operatore*: in questo modo si è cercato di ridurre al minimo la possibilità di errore al momento del sampling nonché di rispettare il timing ottimale alla successiva analisi, prevenendo decomposizioni cellulari e possibili contaminazioni. Si è cercato in questo modo anche di dimostrare la ripetibilità e l'affidabilità della procedura.

- 3) *Il lavaggio gastrico è risultato essere una procedura sicura ed innocua per i pazienti:* nella maggior parte dei casi (75 su 80 casi) esso è stato eseguito in sala operatoria quando il paziente era sedato e intubato con tubo oro-tracheale correttamente in sede e cuffiato, azzerando in tal modo la possibilità di polmonite ab ingestis nelle vie respiratorie e, più in generale di discomfort (nausea, vomito, dolore, fastidio, stordimento) per il paziente. Un'ulteriore evoluzione di questa tecnica è stata proposta nel 2003 dal gruppo di Pesaro con l'introduzione di una capsula (assorbente gli oncomarcatori presenti nel succo gastrico) che veniva fatta deglutire dai pazienti dopo essere stata assicurata ai denti tramite un filo di Nylon lungo circa 45-50 cm: la procedura è risultata essere sicura e senza reazioni avverse come nausea o altro discomfort.⁵⁶ Tuttavia, l'indicazione alla deglutizione della capsula ci sembra ristretta al solo dosaggio degli oncomarcatori, in quanto un lavaggio della cavità gastrica permette un miglior washing della stessa aumentando le possibilità per le cellule lesionali di esfoliare una volta "lavate" dallo strato mucoso-viscoso che le riveste (vedi sezione 8.1 dei Materiali e Metodi).
- 4) Nel nostro studio, la citologia su lavaggio gastrico positiva per la presenza di cellule cancerose (**GL1**) è risultata correlarsi in maniera statisticamente significativa (tramite test del chi-

quadrato) ai pazienti con un T avanzato (**T3-T4** vs T1-T2) (p 0,0317) e a quelli con metastasi linfonodali loco-regionali (**N+** vs N0) (p 0,0024). Questi risultati indicano con una certa affidabilità che *la probabilità che le cellule tumorali si riversino nel lume gastrico (e siano quindi raccolte dal lavaggio gastrico) aumenta con l'aumentare dell'invasività loco-regionale del tumore intesa come grado di infiltrazione negli strati della parete gastrica (classificazione T) e come capacità di metastatizzazione linfonodale (classificazione N).* GL1 si è correlato anche con il parametro **M1** ($p = 0.0030$) ossia con la capacità di metastatizzazione a distanza. Infine, un'associazione statisticamente significativa si è anche registrata anche tra GL1 e **LV1** ($p=0.0028$) ossia con la capacità neoplastica di invasione linfo-vascolare. Questi risultati, ossia la **correlazione statisticamente significativa del GL1 con i parametri T3-T4, N+, M1 e LV1**, ci autorizzano a considerare GL1 come un'ulteriore espressione di un comportamento particolarmente aggressivo di questa neoplastia e vanno a corroborare l'ipotesi da noi formulata in precedenza che vede **l'esfoliazione intragastrica delle cellule cancerose come la sesta via di metastatizzazione seguita da questo tumore.**⁵⁴

Sempre in precedenza, infatti, su risultati preliminari di 38 pazienti affetti da adenocarcinoma gastrico, il nostro gruppo di ricerca aveva già intravisto la correlazione (statisticamente significativa) tra GL1 e alcuni parametri di invasività neoplastica (T3-T4 e N+) (che sono ritenuti i più importanti fattori prognostici del tumore gastrico), ma non aveva trovato alcuna evidenza di associazione con la prognosi (p non significativo).⁵⁴⁻⁵⁵ Questa volta, sia aumentando il numero di casi (da 38 a 80) sia allungando il tempo di follow-up (follow-up medio per paziente da 7,46 a 17,11 mesi), non soltanto abbiamo confermato la correlazione con il T3-T4 e con l'N+, ma abbiamo trovato anche quella con LV1 nonché con M1: in definitiva, quindi, GL1 si associa con un tumore aggressivo (LV1), localmente-avanzato (T3-T4) con metastasi linfonodali (N+) o a distanza (M1). Inoltre, sempre questa volta, siamo riusciti a dimostrare anche il significato prognostico di **GL1**: all'analisi multivariata, infatti, esso è risultato essere l'**unico fattore predittivo indipendente negativo di sopravvivenza (sia di sopravvivenza globale sia di quella libera da progressione di malattia, $p=0.0013$ e $p=0.0107$ rispettivamente)**. Alle curve di Kaplan-Meier, infatti, l'OS media è risultata pari a 23 mesi per i pazienti GL1 e di 42 mesi

per quelli GL0. Simili risultati, tutti ottenuti con significatività statistica al metodo di Kaplan-Meier, si sono registrati per la PFS, TTP e DFS.

Inoltre, nell'analisi per sottogruppi, nei pazienti T1, in quelli N0 e con stadio iniziale (Stadio I), GL1 ha determinato con sicurezza statistica una peggiore sopravvivenza globale media rispetto a quelli GL0 (rispettivamente di 12,6 vs 47,8 mesi per quelli T1, di 16,1 vs 48,4 per i pazienti N0 e 15,5 vs 46,7 mesi per i pazienti in Stadio I): tale dato da un lato rafforza la caratteristica predittiva negativa di GL1 e la sua natura di fattore prognostico indipendente, dall'altro, qualora confermato da ulteriori studi arruolanti un numero maggiore di pazienti, potrebbe aiutare ad inquadrare meglio i pazienti appartenenti ad uno stesso stadio (come lo stadio I) ma con fattori prognostici differenti (ossia negativi, come GL1, LV1, Pn1 e così via) e ritenerli meritevoli, forse, di una differente opportunità terapeutica.

I limiti del nostro studio sono soprattutto due: da una parte il modesto numero di pazienti esaminati, dall'altro il follow-up eterogeneo (follow-up massimo di 55 mesi per un solo paziente e un follow-up di soli 3 mesi per 5 pazienti).

- 1) *Il primo fattore, e cioè lo scarso numero di pazienti*, può aver contribuito al mancato raggiungimento, da parte di GL1, della significatività statistica di alcuni endpoints sia nella correlazione con gli altri parametri, sia nei dati di sopravvivenza.
- 2) *Il secondo fattore, e cioè il follow-up troppo eterogeneo e troppo breve* per alcuni pazienti esaminati, ha senza dubbio giocato un ruolo importante nel raggiungimento (o anche mancato raggiungimento) di una significatività di correlazione e prognosi nei vari obiettivi esaminati.

Al fine di minimizzare il più possibile gli errori nel calcolo e nella interpretazione dei dati, rimaniamo curiosi nel riesaminare i risultati qui ottenuti a una distanza di tempo più ampia, più omogenea e con una casistica arricchita. Dovessero, anche in quel caso, venire confermati i risultati fin qui ottenuti, il significato clinico-patologico (di aggressività tumorale) e il valore prognostico (negativo) di GL1 sarebbero da intendersi sicuri e affidabili. Inoltre tale parametro, allorchè presente, potrebbe essere usato nell'identificazione e differenziazione dei pazienti con prognosi diversa (cioè peggiore) e, per questi, aiutare a ottimizzare e standardizzare il giusto percorso terapeutico.

11. CONCLUSIONI

L'esame citologico eseguito nel lavaggio gastrico dei pazienti neoplastici esaminati ha dimostrato una presenza di cellule neoplastiche (GL1) maggiormente frequente fra quelli con un adenocarcinoma gastrico avanzato (T3-T4) e che fosse capace di determinare metastasi linfonodali (N+), metastasi a distanza (M1) e invasione linfo-vascolare (LV1) rispetto ai tumori più iniziali ($p < 0,05$).

La correlazione significativa del GL1 con questi parametri come pure la sua capacità di fattore prognostico evinta in questo studio ci infondono molto interesse circa l'opportunità di continuare questo tipo di ricerca.

Siamo convinti che a tutt'oggi le armi in nostro possesso da impiegare nella lotta contro questo tumore non siano ancora tutte conosciute: la conoscenza del GL0 vs GL1 potrebbe fornircene una. Studi ulteriori dovrebbero farci capire se questa possa essere importante e di aiuto ai pazienti colpiti da questo tipo di cancro.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015;65(2):87-108.
2. Biasco G, Paganelli GM, Azzaroni D et al. Early gastric cancer in Italy, Clinical and pathological observation on 80 cases. *Dig Dis Sci* 1987;32:113-20.
3. Kidokoro T, Haysashida Y, Urabe M, Watanabe S, Maekawa K, Kumagai K. Progress of gastric carcinoma diagnosis and long term surgical results of early carcinoma. *Acta Endoscop* 1981;11:133-35.
4. Rajdev L. Treatment options for surgically resectable gastric cancer. *Curr Treat options Oncol* 2010;11(1-2):14-23.
5. Lim L, Michael M, Mann GB, et al. Adjuvant therapy in gastric cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(25):6220-32.
6. Yoo CH, Noh SH, Shin DW, et al. Recurrence following curative resection for gastric carcinoma. *Br J Surg* 2000;87:236-42.
7. Benevolo M, Mottolese M, Cosimelli M, et al. Diagnostic and prognostic value of peritoneal immunocytology in gastric cancer. *J Clin oncol* 1998;16:3406-11.
8. Heyward WL, Lanier AP, MacMahon BJ, Fitzgerald MA, Kilkenny S, Paprocki TR. Early detection of primary liver cancer. *JAMA* 1985;254:3052-54.
9. Kew MC. Hepatocellular carcinoma. *Postgrad Med J* 1983;59:78-87.
10. Finlay IG, McArdle CS. Role of carcinoembryonic antigen in detection of asymptomatic disseminated disease in colorectal carcinoma. *Br Med J* 1983;286:1242-43.

11. Goldenberg D, Kim EE. CEA radioimmunodetection in the evaluation of colorectal cancer and in the detection of occult neoplasm. *Gastroenterology* 1983;84:524-32.
12. Tatsuta M, Yamamura H, Iishi H et al. Values of Ca 19.9 in the serum, pure pancreatic juice and aspirated pancreatic material in the diagnosis of malignant pancreatic tumors. *Cancer* 1985;56:2669-73.
13. Yoshikawa T, Nishida K, Tanigawa M, Fukumoto K, Kondo M. Carbohydrate antigenic determinant (Ca 19.9) and other tumor markers in gastrointestinal malignancies. *Digestion* 1985;31:67-76.
14. Uehara Y, Kojima O, Ikeda E et al. Detection of cancer bearing state in gastrointestinal cancer patients by determination of total sialic acid (TSA), hexose and carcinoembryonic antigen (CEA). *J Exp Clin Cancer Res* 1984;3:291-95.
15. Moss KB, Wolfrum DI, Rauschecker H. Determination of tissue polypeptide antigen (TPA) levels in different cancer types and controls. *Oncology* 1985;42:288-95.
16. Sugarbaker PH. Follow-up of colorectal cancer. *Tumori* 1995;3:126-34.
17. Benevolo M, Mottolese M, Cosimelli M, et al. Diagnostic and prognostic value of peritoneal immunocytology in gastric cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:3406-11.
18. Koga S, Kaibara N, Itsuka Y, et al. Prognostic significance of intraperitoneal free cancer cells in gastric cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 1984;108:236-8.
19. Homma Y, Ushida S, Yamada M, et al. Positive peritoneal washing cytology in multiple cavities can predict poor prognosis of advanced gastric cancer patients. *Ann Surg Oncol* 2010;17(2):455-60.
20. I Numeri del cancro in Italia. AIOM-AIRTUM 2014.

21. Surveillance Epidemiology and End Results. Cancer statistics Review 1975-2007.
22. The AJCC Cancer Staging Manual, 7th edition, 2010. Springer-Verlag.
23. Japanese Research Society for Gastric cancer. Japanese classification of gastric carcinoma. 2nd English edition. Gastric Cancer 1998;1:11-24.
24. MacDonald JS, Smalley SR, Jacqueline B, Scott AH, et al. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. N Engl J Med 2001;345(10):725-30.
25. Bang YJ, Kim YW, Yang HK, Chung HC, Park YK, et al. Adjuvant capecitabine and oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): a phase 3 open-label, randomized controlled trial. Lancet 2012;379(9813):315-21.
26. Nishida T. Adjuvant therapy for gastric cancer after D2 gastrectomy. Lancet 2012;379:291-92.
27. GASTRIC (Global Advanced/Adjuvant Stomach Tumor Research International Collaboration) Group, Paoletti X, Oba K, Burzykowski T, Michiels S, et al. Benefit of adjuvant chemotherapy for resectable gastric cancer: a meta-analysis. JAMA 2010;303:1729-37.
28. Van Hagen P, Hulshof MCCM, van Lanschot JJB, Steyerberg EW, et al. Preoperative chemoradiotherapy for esophageal or junctional cancer. N Engl j Med 2012;366(22):2074-2084.
29. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. N Engl j Med 2006;355(1):11-20.

30. Chua YJ, Cunningham D. The UK NCRI MAGIC Trial of perioperative chemotherapy in resectable gastric cancer: implications for clinical practice. *Annals of Surgical Oncology* 2007;14(10):2687-2690.
31. Yehou M, Boige V, Pignon JP, Conroy T, et al. Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III Trial. *J Clin Oncol* 2011; 29(13):1715-1721.
32. Marini G. *Clin Med Ital* 1910;2:65.
33. Papanicolau GN. *Am J Publ Health* 1948;38:202.
34. Papanicolau GN, Cooper F. *J Nat Cancer Inst* 1947;7:354.
35. Papanicolau GN, Traut HF. *Am J Obst Gyn* 1941;42:193.
36. McDonald RJ, Woolner LB. *Min Med* 1949;32:1189.
37. Liebow AA, Lindskog GE, Bloomer WE. *Cancer* 1948;1:233.
38. Shigemitsu S, Yoshiaki S, Susumu T. Cytological diagnosis of gastric cancer by gastroendoscopical method with fibergastroscope. *Gastroenterologica Japonica* 1967;2(2):101-107.
39. Moreno-Otero R, Marròn C, Cantero J, Pajares JM, Martinez-Raposo A. Endoscopic biopsy and cytology in the diagnosis of malignant gastric ulcers. *Diagn Cytopathol* 1989;5(4):366-70.
40. Moreno-Otero R, Martinez-Raposo A, Cantero J, Pajares JM. Exfoliative cytodiagnosis of gastric adenocarcinoma. Comparison with biopsy and endoscopy. *Acta Cytol* 1983;27(5):485-8.
41. Verace V. Evaluation of the cytological examination of the gastric juice in diagnosis of carcinoma of the stomach. *Minerva Chir* 1959;14:1563-1567.
42. Palmer WL, Rubin CE. *Am J Med* 1953;15:439.

43. Rosenthal M, Traut HF. *Cancer* 1951;4:147.
44. Traut HF, Rosenthal M, Harrison JT, et al. *Surg Gn Obst* 1952;95:709.
45. Pollard HM, Bryant HC, Block M, et al. *JAMA* 1949;139:71.
46. Nieburgs HE, Werther JL, Hollander F, Janowitz HD. The cytologic diagnosis of gastric cancer and evaluation of the abrasive brush technic in 125 cases. *Digestive Diseases and Sciences* 1960;5(1):63.
47. Shanghai Gastrointestinal Endoscopy Cooperative Group, People's Republic of China. Value of biopsy and brush cytology in the diagnosis of gastric cancer. *Gut* 1982;23:774-776
48. Smithies A, Lovell D, Hishon S, et al. Value of brush cytology in diagnosis of gastric cancer. *Br Med J* 1975;4:326-8.
49. Winawer S, Posner G, Lightdale CJ, Sherlock P, et al. Endoscopic diagnosis of advanced gastric cancer – factors influencing yield. *Gastroenterology* 1975;69:1183-7.
50. Ekeda S, Imamura A, Takazawa T, et al. Gastric biopsy diagnosis under direct vision. *Gastroenterol Endosc* 1977;19:1-8.
51. Cabre-Fiol V, Vilardeli F, Sala-Cladera E, Mota AP. Preoperative cytological diagnosis of gastric leiomyosarcoma. A report of three cases. *Gastroenterology* 1975;68(3):563-6.
52. Kedra B, Chomczyk M, Zlotkowski M, et al. Cytological picture of the oral mucosa in patients with gastric and colon cancer. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 2012;50(3):375-380.
53. Davey DD. Cervical cytology classification and the Bethesda system. *Cancer J* 2003;9:327-334.

54. Virgilio E, Giarnieri E, Montagnini M, et al. Detection of cancer cells and tumor markers in gastric lavage of patients with gastric cancer: do these findings have a clinicopathological significance and oncological implication? *Med Hypotheses* 2016;94:1-3.
55. Virgilio E, Giarnieri E, Montagnini M, et al. Analyzing gastric lavage of gastric cancer patients: a prospective observational study on cytopathology and determination of intragastric CEA, Ca 19.9, Ca 72.4, and Ca 50. *Acta Cytol* 2016;60(2):161-6.
56. Muretto P, Graziano F, Staccioli MP, Barbanti I, Bartolucci A, Paolini G, Giordano D, Testa E, De Gaetano A. An endogastric capsule for measuring tumor markers in gastric juice: an evaluation of the safety and efficacy of a new diagnostic tool. *Annals of Oncology* 2003;14:105-109.
57. Donkor J, Armenian P, Hartman IN, Vohra R. Analysis of gastric lavage reported to a statewide poison control system. *J Emerg Med* 2016;51:394-400.
58. Huang ES, Karsan S, Kanwal F, Singh I, Makhani M, Spiegel BM. Impact of nasogastric lavage on outcomes in acute GI bleeding. *Gastrointest Endosc* 2011;74:971-80.
59. Nakanishi H, Kurosaki M, Takahashi Y, et al. Pretreatment gastric lavage reduces postoperative bleeding after endoscopic submucosal dissection for gastric neoplasms. *PLoS One* 2016;11:e0149235.
60. Sharma P, Nangia S, Tiwari S, Goel A, Singla B, Saili A. Gastric lavage for prevention of feeding problems in neonates with meconium-stained amniotic fluid: a randomized controlled trial. *Paediatr Int Child Health* 2014;34:115-9.

61. Bates M, O'Grady J, Maeurer M, et al. Assessment of the Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of tuberculosis with gastric lavage aspirates in children in sub-Saharan Africa: a prospective descriptive study. *Lancet Infect Dis* 2013;13:36-42.
62. Baghaei P, Tabarsi P, Farnia P, et al. Utility of gastric lavage for diagnosis of tuberculosis in patients who are unable to expectorate sputum. *J Glob Infect Dis* 2011;3:339-43.

13. RINGRAZIAMENTI

Dottorato di Ricerca in Oncologia: un sogno che si realizza.

Sono molte le persone che voglio ringraziare, prime fra tutte i pazienti inclusi in questa tesi: i loro esempi di vita e di lotta mi sono sempre davanti agli occhi e per me è stato un onore condividere la loro sofferenza così come le loro vittorie.

Ringrazio profondamente la *Professoressa Balducci* per tutti gli insegnamenti e le esperienze lavorative condivise: ne sono ormai da tempo un *fan* per le innumerevoli qualità di chirurgo e di donna.

Il *Prof. Mercantini* è e sarà sempre un chirurgo di riferimento per me: con lui ho iniziato a capire cosa fosse la ricerca in ambito chirurgico e con lui ho mosso i primi passi in tal senso.

Esiste un altro chirurgo verso il quale nutro immensa stima, riconoscenza e affetto: il *Professor Cavallini*.

Ringrazio altresì i colleghi dell'Unità di Citopatologia con cui collaboro ormai da anni: il *Prof. Enrico Giarnieri*, la *Professoressa Maria R. Giovagnoli* e la *Sig.ra Monica Montagnini*. Lavorare con loro è per me motivo di orgoglio e di felicità.

Ringrazio con affetto e stima la *Sig.ra Paola Taglieri*, segretaria del corso del Dottorato di Ricerca, per la capacità, disponibilità e gentilezza, tutte doti preziose dal punto di vista sia professionale sia umano.

I miei genitori ... beh, senza di loro questo traguardo sarebbe rimasto solo un sogno.