



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Facoltà di Farmacia e Medicina

DOTTORATO DI RICERCA IN
EPATO-GASTROENTEROLOGIA
SPERIMENTALE E CLINICA
CURRICULUM FISIOPATOLOGIA
CHIRURGICA E GASTROENTEROLOGIA
XXXII Ciclo

Coordinatore Prof. Paolo Onori

**Mappatura Ex Vivo dei Linfonodi Sentinella
nei tumori Colo-Rettali tramite la
Fluorescenza Vicino all'Infrarosso con
Colorante Vitale Verde di Indocianina e
sviluppo di nuovi fluorofori.**

Dottorando
Andrea Picchetto
Matricola 1050289

Relatore
Prof.ssa Annamaria Pronio

Correlatore
Prof. Michele Diana

Indice

1. Abstract
2. Premessa
3. Introduzione
4. Materiali e Metodi
5. Risultati
6. Discussione
7. Sviluppo nuovi fluorofori
 - a. Materiali e metodi
 - b. Risultati
8. Conclusioni
9. Bibliografia
10. Eventuali Allegati

ABSTRACT

Introduzione

I tumori colo-rettali sono attualmente la seconda causa oncologica di morte per entrambi i sessi. La stadiazione linfonodale è elemento determinante la stadiazione oncologica e la prognosi dei pazienti, con la conseguente indicazione a trattamenti chemioterapici adiuvanti.

Infatti pazienti con malattia linfonodale negativa (N0) hanno una Overall Survival a 5 anni del 70-80%, contro una percentuale del 30-60% nei pazienti N+ (va precisato però che la sopravvivenza in questo gruppo è migliorata dal trattamento chemioterapico adiuvanti).

Nel 20-30% dei pazienti che presentano recidiva di malattia numerosi autori ipotizzano che questa possa essere dovuta a metastasi linfonodali occulte.

Inoltre nella chirurgia oncologica coloretale, l'identificazione dei linfonodi sentinella permette la ricerca delle micrometastasi tramite la cosiddetta "ultrastadiazione" dei linfonodi campionati con sezioni seriate ed indagini immunohistochimiche o reverse transcriptase-polymerase chain reaction (procedure, per i cui costi e tempi, non applicabili su tutti i linfonodi).

Dai dati riportati in letteratura, è stata evidenziata una prognosi peggiore nei pazienti pN0 affetti da micrometastasi ed è tuttora oggetto di dibattito la chemioterapia adiuvante in questi pazienti.

Il verde indocianina è stato proposto nell'identificazione intraoperatoria dei linfonodi sentinella tramite Fluorescenza vicina all'infrarosso, come già validato

nei tumori della mammella e del compartimento testa/collo e nel melanoma cutaneo.

Materiali e metodi

Sono stati inseriti nello studio i pazienti sottoposti a chirurgia coloretale per neoplasia presso il Dipartimento di Chirurgia Generale “P. Stefanini” dell’AOU Policlinico “Umberto I” di Roma e Dipartimento di Chirurgia Generale dell’Ospedale di Fidenza (AUSL di Parma).

Come da protocollo, sul pezzo operatorio a fresco appena resecato, dopo apertura del viscere e identificazione del tumore, viene iniettato 1ml di colorante, su mucosa sana, equidistribuito sui quattro punti cardinali peritumorali. Dopo circa 5-7 minuti vengono identificate e prelevate le sedi di maggior fluorescenza sul tessuto linfoadiposo mesenteriale per essere sottoposte ad esami di ultrastadiazione.

Per ogni paziente inoltre sono stati rilevati i dati dell’esame istologico, in particolare la correlazione con la stadiazione linfonodale in riferimento al linfonodo sentinella

Risultati

Nel corso di questo periodo 58 pazienti sono stati sottoposti a resezioni oncologiche coloretali VLS standard. In ogni paziente è stato identificato almeno 1 SLN. Dal campionamento di tutti pezzi operatori sono stati repertati 1085 linfonodi (117 SLN, media 2.01).

Nei pazienti N0 sono stati trovati trovati 54 SLN (media 1,9).

La detection rate e la sensitivity rate sono state del 94,8% (55/58 pts) e del 100% (30 SLN+ / 30 N+ pts) rispettivamente. La false negative rate è stata dello 0%. In questa serie preliminare, l'assetto istologico dei SLN (sia negli N+ che negli N0) ha correttamente predetto lo stato dei linfonodi loco-regionale.

Dopo gli esami di ultrastadiazione, sono state riscontrate micrometastasi nei SLN N0 in 4 pazienti (14%, 4/28 NND pts) che sono stati così ri-stadiati come N1 ed inviati a trattamento chemioterapico adiuvante.

Conclusioni

Nella nostra serie preliminare, la mappatura NIRF dei SLN con tecnica ex-vivo ha predetto correttamente lo stato linfonodale loco-regionale, come confermato all'esame istologico. L'identificazione delle micrometastasi ha permesso a 4 pazienti precedentemente stadiati come N0 di beneficiare del trattamento chemioterapico adiuvante con l'obiettivo di ridurre il rischio di recidiva. Il colorante vitale verde di indocianina però risulta non ottimale per la ricerca dei linfonodi sentinella e vi è la necessità di sviluppare e testare nuovi fluorofori, nuovi software e hardware per migliorare, nel futuro, le mappature linfonodali.

INTRODUZIONE

Il tumore coloretale (CRC) rimane, nonostante le importanti campagne di prevenzione, la neoplasia con la terza incidenza per entrambi i sessi e la seconda causa di morte oncologica per entrambi i sessi in Europa e nel mondo.[1]

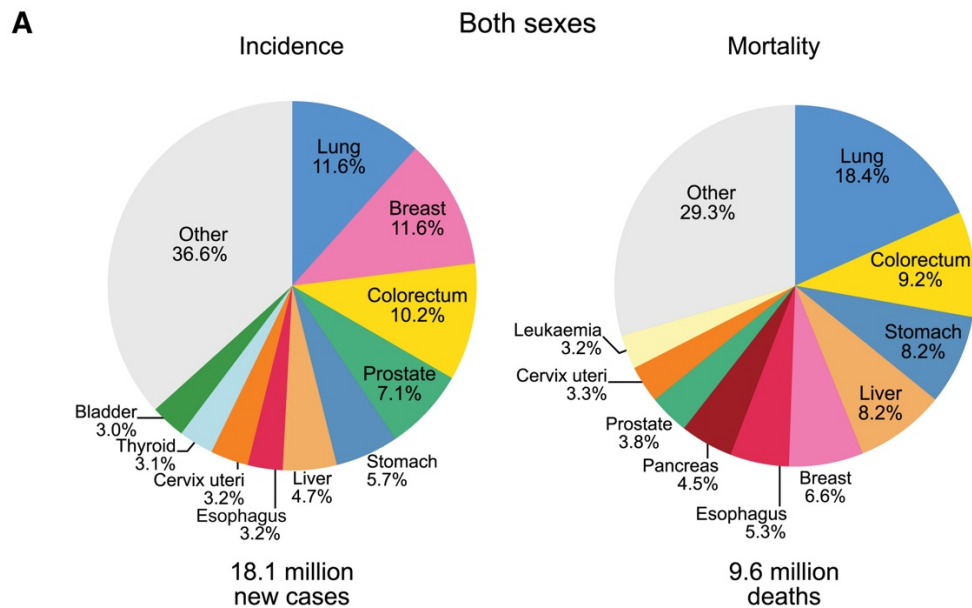


Figura 1 Pie Charts Present the Distribution of Cases and Deaths for the 10 Most Common Cancers in 2018 for (A) Both Sexes. The area of the pie chart reflects the proportion of the total number of cases or deaths; nonmelanoma skin cancers are included in the "other" category. Source: GLOBOCAN 2018.[1]

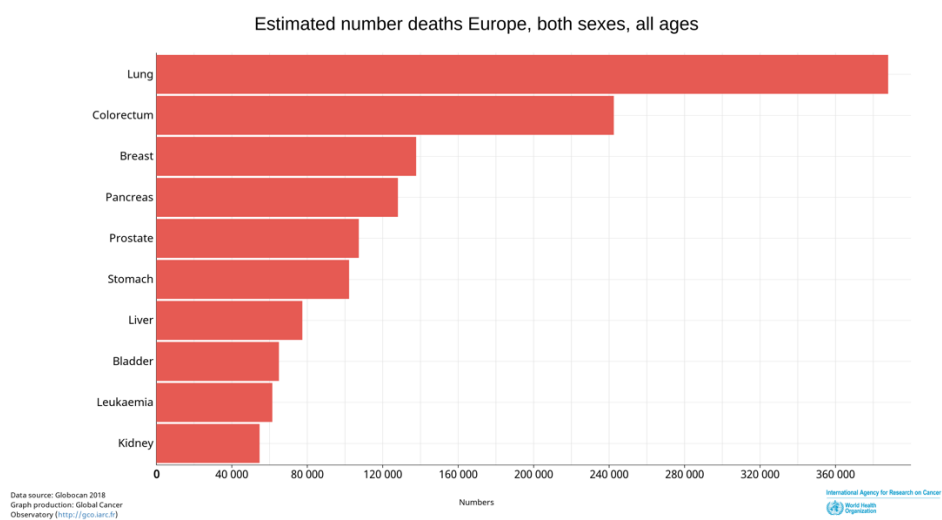


Figura 2 Numero stimato di morti per neoplasia in Europa nel 2018. Fonte Globocan 2018

La stadiazione linfonodale rappresenta tuttoggi un fattore prognostico fondamentale, che spesso determina la necessità o meno di un trattamento chemioterapico adiuvante.[2].

Infatti, se la sopravvivenza globale (OS) a 5 anni nei pazienti con malattia linfonodale negativa (NND o N0) può arrivare al 70-80% dei casi, questa si riduce al 30-60% (in base alle casistiche) per i pazienti con malattia linfonodale positiva (N+).

Rimane comunque un 20-30% di casi in media che, nonostante fossero stadiati come NND presentano una ripresa di malattia a distanza. Si è quindi ipotizzato che vi fossero presenti delle metastasi linfonodali occulte che potessero essere responsabili della ripresa di malattia nei pazienti (apparentemente) NND. [3]

Attualmente, nonostante non vi sia totale concordanza in letteratura, la raccomandazione durante le resezioni colo-rettali oncologiche standard è di ottenere dal pezzo operatorio un minimo di 12 linfonodi. [3, 4]

In base all'ultima edizione (8th) dell'AJCC Cancer Staging Manual (Gennaio 2018), la presenza delle micrometastasi linfonodali dovrebbe essere stadiata come N1 e non più come come N1mi (come richiesto nella precedente edizione AJCC). [5, 6]. Questo è un importante cambiamento effettuato dall'AJCC che, dal momento che vi sono evidenze che i trattamento chemioterapici adiuvanti migliorano la OS nei pazienti N+, mira a ridurre il rischio di ripresa di malattia a distanza di tempo anche nei pazienti un tempo stadiati come N1mi. [3, 7]

Di contro, va ricordato come le micrometastasi coloretali non siano visibili con le attuali tecniche di imaging preoperatorio e siano purtroppo frequentemente

non identificate durante gli esami anatomopatologici standard. Esse sono di più facile identificazione con le tecniche di ultrastadiazione come le sezioni seriate e le colorazioni immunoistochimiche.

I linfonodi sentinella (SLN) sono definiti come i primi linfonodi che, nel percorso linfatico loco-regionale, drenano un tumore primitivo solido. [8]

Il razionale dietro l'identificazione intraoperatoria e l'analisi dei SLN risiede nell'ipotesi che il loro stadio possa descrivere predittivamente la stadiazione dei restanti linfonodi loco-regionali (non SLN). Questo concetto e metodo di valutazione dei SLN è altamente standardizzato in diversi tipi di tumore, come il melanoma, quello mammario o quelli del distretto testa-collo. Viceversa, quando applicato ai tumori coloretali, il valore del SLN è più controverso, anche perché la sua stadiazione a fresco tipicamente non influenza la strategia chirurgica.

Nonostante ciò, però, è bene sottolineare come l'identificazione intraoperatoria dei SLN possa portare ad una strategia di ultrastadiazione in cui i SLN possano essere posti a test aggiuntivi per il riconoscimento delle micrometastasi, con la capacità potenziale di sovra-stadiare (upstage) i pazienti e quindi influenzare sia le strategie terapeutiche che la loro prognosi.[9]

Inoltre, se scientificamente validato, il concetto di SLN potrebbe divenire ancor più rilevante con l'aumento incessante di procedure sempre più "a risparmio d'organo", come le dissezioni sottomucose endoscopiche (ESD) o le resezioni endoscopiche a tutto spessore (FTR), che possono essere considerate oncologicamente sicure solo negli early e ultra-early stage in cui bisogna avere la certezza che non vi sia coinvolgimento linfonodale. [10, 11]

Attualmente la mappatura dei SLN è eseguita tramite un'iniezione peritumorale di tracciante radioattivo, oppure di un colorante blu visibile ad occhio nudo come il blu isosulfano (IB), o, a volte, con una combinazione di radiotracciante e colorante vitale. Bisogna ricordare come, diversamente da altri tipi di tumore (mammilla, melanoma, etc), nei tumori coloretali, sia il concetto che i metodi per la ricerca e mappatura dei SLN siano carenti di evidenze sia di rilevanza clinica che di standardizzazione. [12-15]

La mappatura dei SLN nei CRC fu inizialmente proposta da Saha durante il 50mo simposio annuale sul cancro della Society of Surgical Oncology nel 1997. Da allora è stata descritta da vari autori riportando risultati favorevoli ma incostanti dal punto di vista dei tassi di accuratezza. Questo si pensa sia dovuto soprattutto alla eterogeneità delle metodiche di mappatura applicate negli anni. [16-19]

I coloranti blu e i traccianti radioattivi sono stati usati come traccianti per l'identificazione dei SLN sia con modalità *in vivo* che *ex vivo*. Indipendentemente dalla modalità, però entrambi presentano alcuni svantaggi: per esempio i coloranti blu sono di difficile visualizzazione nei tessuti adiposi; mentre i radiotraccianti a emissione di raggi gamma espongono il paziente e i sanitari a rischio radioattivo, richiedono il coinvolgimento del servizio di medicina nucleare e implicano alti costi di gestione. [12, 20, 21]

Una promettente alternativa alle attuali tecniche di mappatura linfonodale real-time è data dall'emergente innovazione della chirurgia guidata da fluorescenza (Fluorescence Imaging Guided Surgery FIGS). [22, 23]

Da un'iniezione peritumorale di un fluoroforo (cioè una sostanza che emette un segnale di fluorescenza dopo essere stata illuminata da una sorgente di luce nel vicino infrarosso), è possibile evidenziare sia la via linfatica sia i primi linfonodi drenanti. [24]

La linfografia a fluorescenza nel campo del vicino infrarosso (Near InfraRed Fluorescence NIRF) tramite l'iniezione peritumorale di verde di Indocianina (ICG) presenta alcuni vantaggi verso la linfografia con coloranti blu perché la luce con lunghezza d'onda del vicino infrarosso NIR (700-900 nm) permette un più profonda penetrazione tissutale (circa 1cm), con un alto signal-to-noise ratio fornendo quindi un alto contrasto rispetto alle strutture viciniori.

Il principio fisico di imaging con NIRF si basa sull'illuminazione del tessuto di interesse con una luce con lunghezza d'onda di eccitazione (circa 750-800 nm), e osservazione di tale tessuto su lunghezze d'onda più lunghe (>800 nm). [25]

Vedi Figura 3

Anche se la fluorescenza è soltanto una piccola frazione dell'intensità di eccitazione, si riesce ad ottenere un sorprendente SNR: un oggetto molto fluorescente, per esempio un vaso sanguigno contenente ICG, può essere chiaramente visibile su un fondo quasi completamente nero (vedi Figura 4).

Il Verde di Indocianina (ICG) è una tricarbocianina sviluppata per le fotografie nel campo del vicino infrarosso (NIR) dai laboratori di ricerca Kodak nel 1955 e approvata per uso clinico nel 1956.[26, 27]

Ci sono voluti, comunque, più di dieci anni prima che l'ICG venisse usata per studi angiografici.[28, 29]

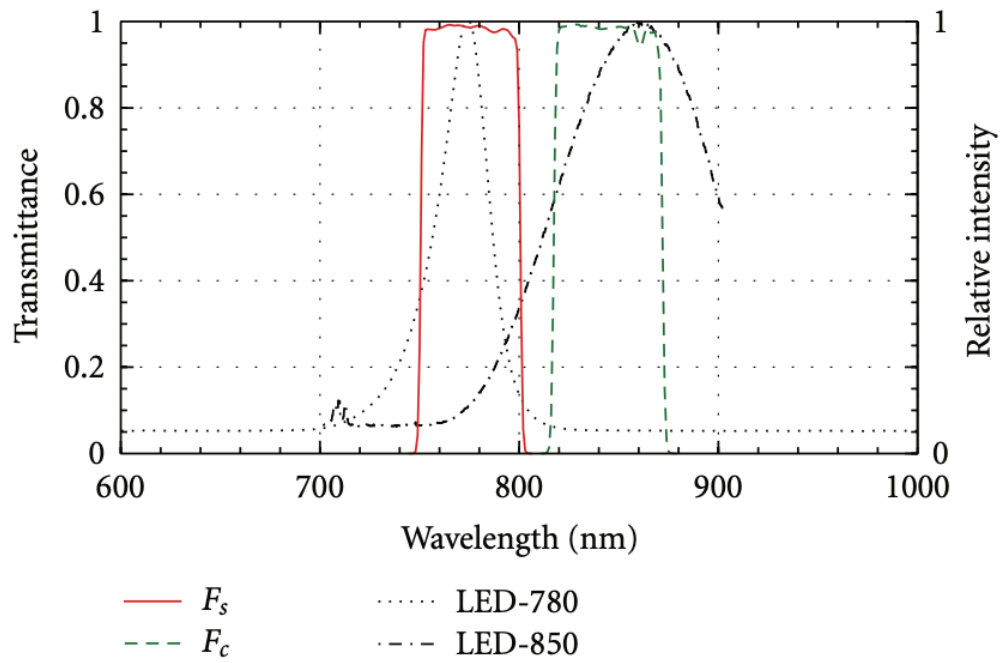


Figura 3 The transmission of the ICG filter pair (F_s : high-pass filter for source; F_c : low-pass filter (barrier) for camera) and the emission spectrum of two NIR LEDs having the nominal peak wavelengths of 780 and 850nm and full width at half maximum (FWHM) bandwidths correspondingly of 30 and 95 nm.



Figura 4 A typical NIRF angiography image: heart of a rat. Coronary arteries clearly visible. Liver shining on the right. Magnification 20 \times .

La concentrazione di ICG nei diversi trial varia da 0,5 a 5 mg/ml mentre la dose da 0,6 a 5 ml per sito neoplastico, generalmente da almeno 5 minuti prima della visualizzazione fino a 24h prima. [15, 30].

L'obiettivo di questo studio prospettico è quello di stabilire la sia la validità che la predittività dell'imaging a fluorescenza vicino all'infrarosso (NIRF) per la ricerca dei SLN con tecnica *ex vivo* in chirurgia resettiva oncologica convenzionale per tumore coloretale e per stabilire l'incidenza di micrometastasi nei pazienti con malattia linfonodale negativa (NND).

MATERIALI E METODI

Pazienti

Verranno inseriti nello studio i pazienti sottoposti a chirurgia coloretale per neoplasia presso l'unità operativa di "Chirurgia Generale ad Indirizzo Coloretale" (Responsabile: Prof. Giancarlo D'Ambrosio) del Dipartimento di Chirurgia Generale "P. Stefanini" dell'AOU Policlinico "Umberto I" di Roma e l'unità operativa di Chirurgia Generale (Direttore: Prof. Vincenzo Violi) del Dipartimento di Chirurgia Generale dell'Ospedale di Fidenza (AUSL di Parma) che attua lo stesso protocollo di studio.

Nel periodo compreso tra Gennaio 2017 e Marzo 2018, sono stati arruolati nello studio 58 pazienti che presentavano un adenocarcinoma del colon retto con indicazione a trattamento chirurgico resettivo, in assenza di evidenza all'imaging di metastasi a distanza (iT_xN_xM₀).

Per essere inclusi nello studio, ogni paziente ha sottoscritto un apposito consenso informato.

Le caratteristiche demografiche globali dei pazienti ed oncologiche sono riassunte in Tabella 1.

Dei pazienti inclusi nello studio, tutti quelli che presentavano tumore del retto sono stati sottoposti ad trattamento radiochemioterapico neoadiuvante long-course standard.

Per ogni paziente sono stati calcolati il numero dei linfonodi sentinella identificati (SLN), la detection rate (DR), la sensitivity rate (SR), la false-negative (FN) rate e la upstaging (US) rate.

La detection rate è stata calcolata come la proporzione dei pazienti con linfonodi sentinella identificati tramite la fluorescenza vicino all'infrarosso (NIRF) con ICG, sul campione totale dei pazienti per 100.

La sensitivity rate della ricerca dei linfonodi sentinella tramite NIRF è stata definita come il numero dei pazienti con almeno un linfonodo sentinella positivo X 100, diviso il numero totale dei pazienti con qualunque linfonodo positivo dopo dissezione ed esame anatomopatologico convenzionale sul pezzo operatorio estratto.

La false negative rate è stata definita come la proporzione dei pazienti con linfonodi sentinella senza evidenza di cellule neoplastiche, ma che hanno presentato ripetizioni neoplastiche linfonodali nei linfonodi non sentinella.

La upstaging rate è stata assunta come la proporzione dei pazienti che, pur avendo linfonodi negativi per ripetizione neoplastica all'esame anatomopatologico convenzionale, presentavano micrometastasi nei linfonodi sentinella sottoposti ad esami di ultrastadiazione.

Per ogni paziente inoltre verranno rilevati i dati dell'esame istologico, in particolare la correlazione con la stadiazione linfonodale in riferimento al linfonodo sentinella.

Al termine dello studio si otterranno informazione su:

- Contributo dell'ultrastadiazione del linfonodo sentinella nel modificare la stadiazione N e l'eventuale indicazione al trattamento chemioterapico adiuvante.
- Utilità dell'impiego del verde indocianina nel migliorare i risultati immediati e oncologici nei pazienti con neoplasie colon rettali.

Procedure

Tutti i pazienti inclusi nello studio sono stati sottoposti a resezioni coloretali oncologiche standard con approccio videolaparoscopico e nello specifico: emicolectomie destre (n=26); emicolectomie sinistre (n=9); resezioni anteriori del retto (n=16); resezioni coliche atipiche (n=7). Vedi Tabella 1.

Il pezzo operatorio estratto veniva quindi posizionato su un tavolo servitore di Mayo in sala operatoria ed aperto in senso longitudinale. Identificata quindi la neoformazione coloretale sul versante endoluminale, veniva iniettata 1ml di verde di indocianina (10 mg/ml) in maniera equipartita su quattro quadranti attorno al tumore su mucosa macroscopicamente sana (Figura 5) con l'obiettivo di identificare i canali linfatici ed i linfonodi sentinella tramite la NIRF.

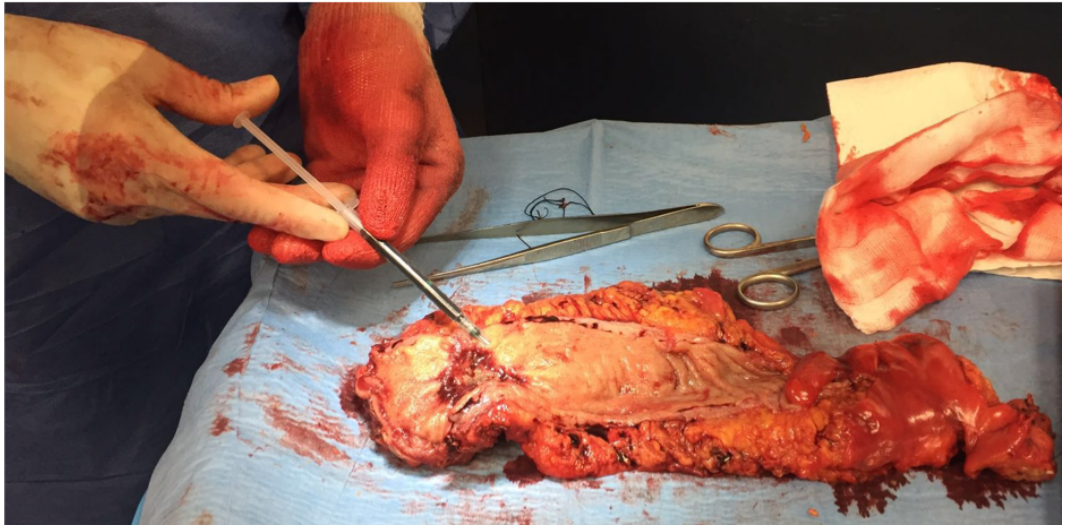


Figura 5 Iniezione sottomucosa di ICG nei quadro quadranti dopo estrazione del pezzo operatorio e sua apertura longitudinale

Dopo un periodo di latenza medio di circa 7-10 minuti era possibile identificare sia i canali linfatici (Figura 6) che i linfonodi sentinella tramite l'imaging a fluorescenza.

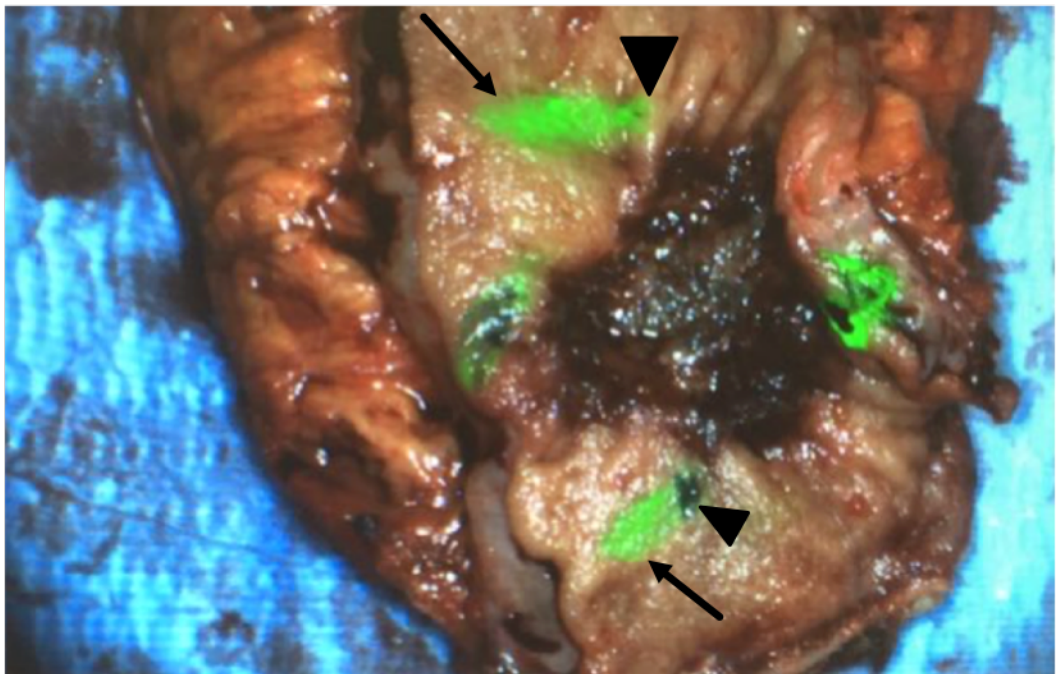


Figura 6 Freccia Nera: identificazione dei canali linfatici; Punta di Freccia Nera: sito di iniezione sottomucosa dell'ICG

I linfonodi che diventavano fluorescenti nei primi 15 minuti sono stati quindi isolati e dissecati dal mesocolon (o dal “cosiddetto” mesoretto) (Figura 7), etichettati come SLN1 (SLN2, SLN3, etc) ed inviati al servizio di anatomia patologica, seppur contestualmente al pezzo operatorio standard, ma in contenitori separati.

L’identificazione dei linfonodi sentinella tramite NIRF e la loro dissezione è stata eseguita da chirurghi esperti nel campo della fluorescenza vicino all’infrarosso.

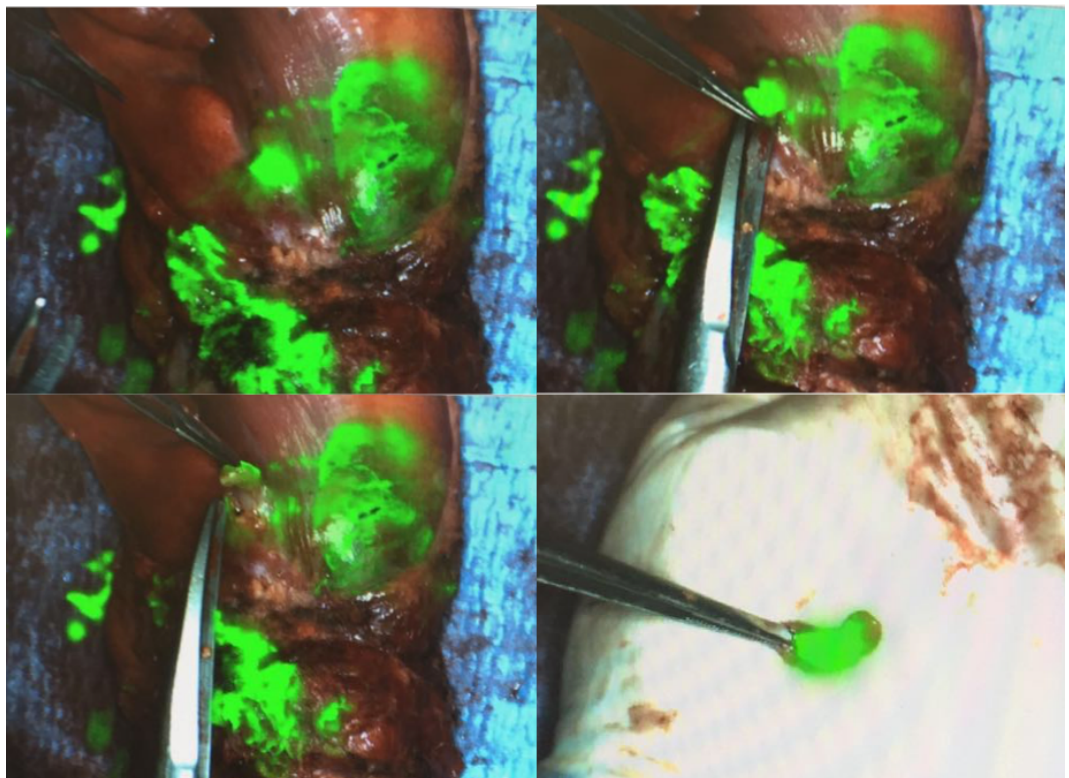


Figura 7 Identificazione e asportazione di un linfonodo sentinella nel (cosiddetto) mesoretto sottoposto a trattamento radiochemioterapico neoadiuvante tramite NIRF.

Esami anatomopatologici

Tutti i pezzi operatori sono stati esaminati tramite le normali tecniche anatomopatologiche convenzionali. I campioni identificati con linfonodi sentinella

sono stati sezionati ad intervalli di 2mm ed ogni sezione inviata per analisi istopatologica. I linfonodi sentinella sono stati analizzati in base alle attuali linee guida oncologiche (sec. AJCC Cancer Staging Manuale 8th edition) da due anatomopatologi in cieco.[5]

Ogni linfonodo sentinella nei pazienti stadiati come Node Negative Disease (NND o N0) all'esame anatomopatologico convenzionale è stato ulteriormente investigato con tecniche di ultrastadiazione, che includono sezioni seriate e colorazioni immunohistochimiche aggiuntive, in maniera da identificare la presenza di micrometastasi. (Figura 8)

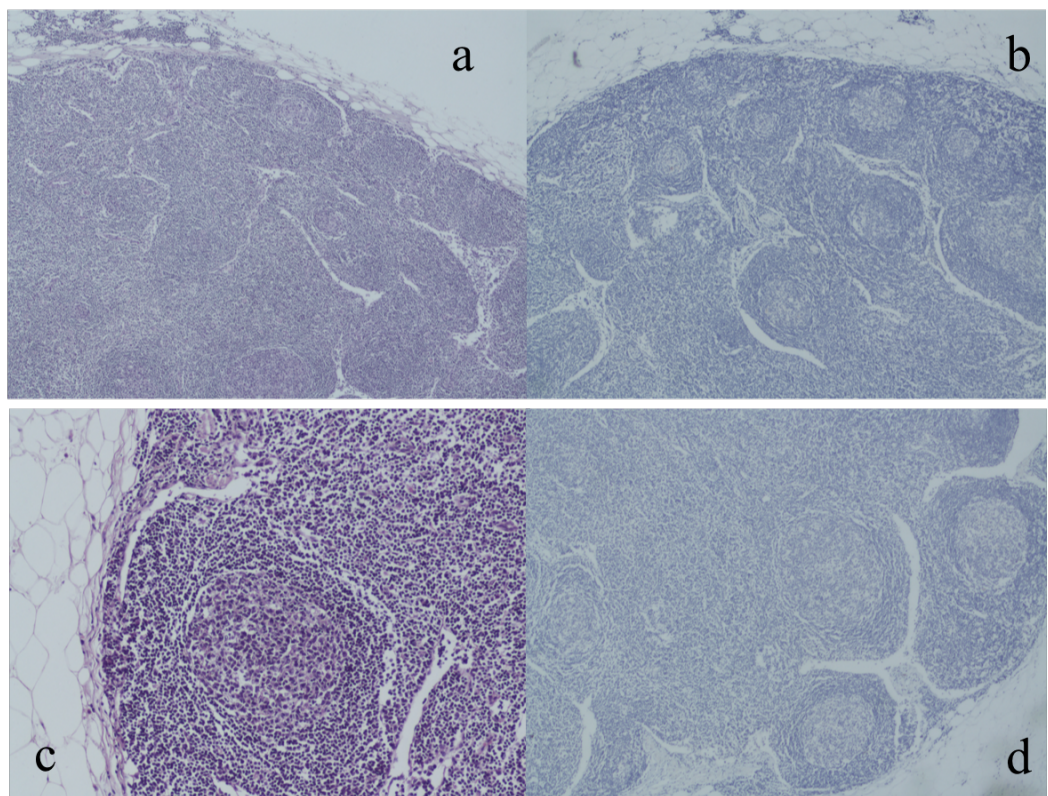


Figura 8 SLN: a) e c) colorazione con E/E con magnificazione 4X e 10X che mostra un linfonodo negativo per cellule neoplastiche; b) e d) colorazione immunohistochimica per le citocheratine A1 e A3 con magnificazione 4X e 10X negativa per cellule neopl. epiteliali

La novità di questo studio giace nell'identificazione delle micrometastasi, che sono definite come gruppi (clusters) di 10-20 cellule tumorali o ammassi (clumps) di cellule neoplastiche maggiori di 0.2mm di diametro. Nell'ultima edizione dell' American Joint Committee on Cancer (AJCC) Staging Manual and Handbook, la presenza di micrometastasi nei linfonodi è stata ridefinita come linfonodo positivo standard (N1) e non più come N1mi come precedentemente riportato nella precedente edizione del 2010. [2, 5, 6]

L'ultrastadiazione dei linfonodi sentinella risultati N0 all'esame anatomopatologico convenzionale è stata eseguita tramite 5 micro-sezioni multilivello di 30µm, con 4 sezioni colorate con ematossilina e eosina e una sezione immuno-colorata per il cocktail di citocheratine AE-1/AE-3 in accordo con il protocollo Novocastra (Bond-Leica Systems)[8]. Il restante pezzo operatorio, inclusi tutti i linfonodi non etichettati come sentinella, è stato esaminato con metodi di anatomia patologica convenzionale. Tutti i linfonodi non-sentinella sono stati poi successivamente ultrastadiati in maniera retrospettiva eseguendo 5 ulteriori sezioni colorate con ematossilina e eosina a 30µm ognuna.

Tabella 1 Caratteristiche demografiche ed oncologiche dei pazienti arruolati nello studio

	CRC (n=58) N0 (n28)
Age (ys) median and range	73,2 (59-88)
BMI (Kg/m²), mean	24,57 (19,8 – 29,2)
Neoplasia localization	
Right colon	26
Splenic flexure	7
Left colon	9
Sigmoidorectal giunction	6
Rectum	10
Procedure	
Right colectomy	26
Atypical colectomy	7
Left colectomy	9
RAR	16

RISULTATI

Dalle indagini anatomopatologiche convenzionali (vedi Tabella 2), lo stadio pT nei 58 pazienti era distribuito come di seguito riportato: pT1 (n=10), pT2 (n=10), pT3 (n=24), and pT4 (n=14) adenocarcinomi.

Dai pezzi operatori sono stati repertati 1085 linfonodi (18,7 media).

I linfonodi sentinella localizzati in profondità nel grasso mesocolico e mesorettale sono stati facilmente identificati tramite la fluorescenza vicino all'infrarosso con ICG anche nel "cosiddetto" mesoretto (vedi Figura 7)

Il numero totale di linfonodi sentinella (SLN) è stato 117 (2,01 di media, range: 1-9).

La stadiazione linfonodale agli esami anatomopatologici è risultata come segue: 28 pN0, 16 pN1, 13 pN2 e 1 pN3, per un totale di 30 pazienti con malattia linfonodale positiva N+.

Tabella 2 Risultati anatomopatologici convenzionali

Tumor staging by histology	
pT1	10
pT2	10
pT3	24
pT4	14
Nodal staging	
pN0	28
pN1	16
pN2	13
pN3	1
Mean number (total) of LN excised	18,7 (1085)
Mean number (range) of SLN excised	2,01 (1-9)

La detection rate è risultata essere del 94,8% (55/58 pts). Vedi Tabella 3.

Tutti i pazienti con presenza di malattia linfonodale positiva per ripetizioni neoplastiche alle indagini anatomopatologiche convenzionali hanno presentato linfonodi sentinella con metastasi da adenocarcinoma del grosso intestino, confermando quindi una sensitivity rate del 100% (30 SLN+ / 30 N+ pts).

Pazienti con malattia linfonodale negativa (NND)

I restanti 28 pazienti che non presentavano malattia metastatica linfonodale all'esame anatomopatologico standard (pN0) sono stati ulteriormente sottoposti ad accertamenti di ultrastadiazione e le loro caratteristiche sono riassunte nella Tabella 3.

Non è stata riscontrata alcuna invasione perineurale in nessuno dei pazienti con malattia linfonodale negativa (NND) e l'invasione linfovaskolare è stata riportata in 4 casi.

In tutti i casi NND è stato identificato tramite la fluorescenza vicino all'infrarosso con verde di indocianina con tecnica ex-vivo almeno un linfonodo sentinella (media: 1.93; range: 1-6; totale: 54).

Non sono stati riportati casi di falso negativo (0/28 NND pts), riportando così una false negative rate dello 0%.

Come da protocollo, ogni linfonodo sentinella dei pazienti NND è stato sottoposto alle sovradescritte tecniche di ultrastadiazione che hanno evidenziato la presenza di micrometastasi (vedi Figura 9) in quattro pazienti.

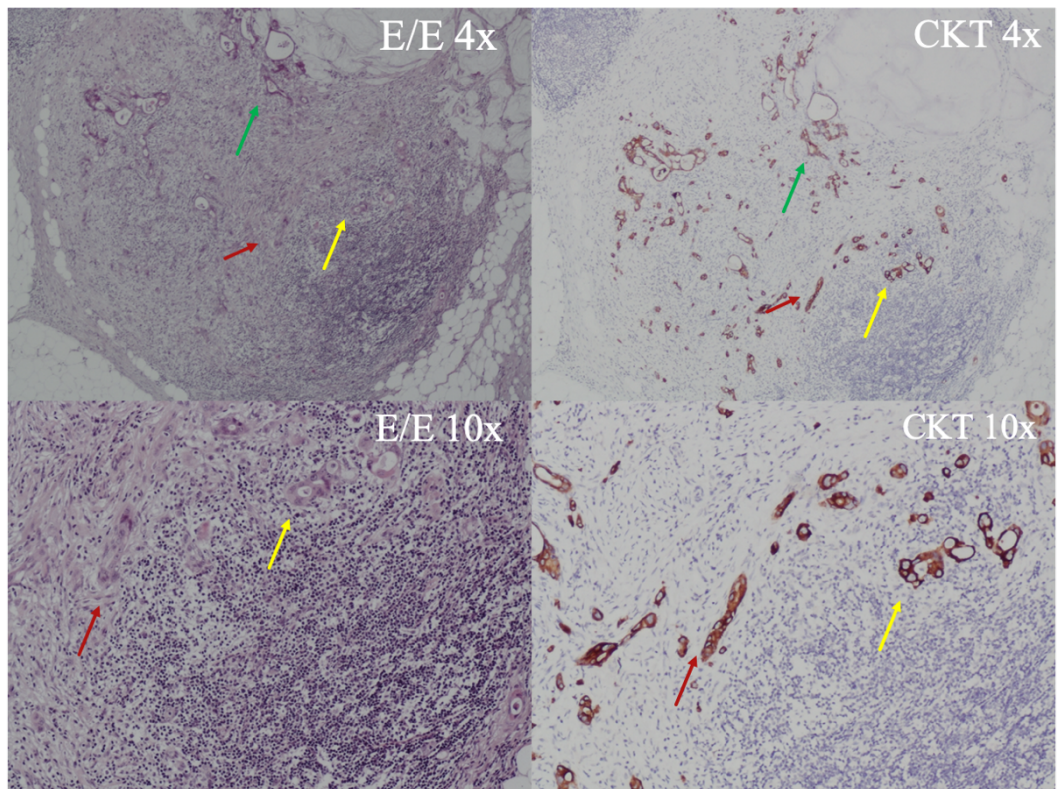


Figura 9 Micrometastasi evidenziate in un SLN pN0 tramite tecniche di ultrastadiazione positive alle immunocolorazioni per le citocheratine A1/A3 (vedi frecce colorate).

Questi pazienti, quindi, in accordo con l'attuale manuale di stadiazione oncologica dell'AJCC sono stati ri-stadiati da pN0 a pN1.

Tale ri-stadiazione in pN1 secondo le attuali linee guida italiane ed internazionali prevede la rivalutazione per eventuale trattamento chemioterapico adiuvante con l'obiettivo di ridurre il rischio di recidiva di malattia a distanza nel tempo.[2, 3, 7]

Questo risultato ha conseguentemente attestato la upstaging rate al 14% (4/28pts NND).

Tabella 3 Risultati della Detection, Sensitivity, False Negative e Upstaging Rate

Detection Rate	94,8% (55/58 pts)
Sensitivity rate	100% (30 SLN+ / 30 N+ pts)
False negative Rate	0% (0/28 NND pts)
Upstaging Rate	14% (4/28 NND pts)

DISCUSSIONE

L'identificazione delle micrometastasi nei linfonodi sentinella nei tumori coloretali è stata recentemente adottata come uno degli elementi chiavi nell'identificazione dei pazienti da candidare ad eventuale trattamento chemioterapico adiuvante.[2]

L'imaging con fluorescenza nel campo del vicino infrarosso (NIRF), con utilizzo del verde di indocianina (ICG) come fluoroforo, è una tecnica di imaging sempre più utilizzata in chirurgia addominale.

Vari campi di applicazione nella chirurgia dell'apparato digerente sono l'angiografia a fluorescenza per la valutazione della perfusione d'organo e quindi anastomotica [31-36], la colangiografia a fluorescenza per migliorare l'identificazione dell'anatomia biliare extraepatica [37-39] e anche l'identificazione della mappatura linfonodale locoregionale dei tumori gastrointestinali [15, 40-44].

La NIRF si è dimostrata un valido strumento per il riconoscimento real-time dei linfonodi sentinella di tumori coloretali sia con tecnica "in vivo" che "ex vivo".

Diversi autori hanno pubblicato dati sulla ricerca dei linfonodi sentinella coloretali tramite l'utilizzo di coloranti a base di blu o radiotraccianti. Nonostante le diverse pubblicazioni eseguite, i risultati non sono ne' sovrapponibili, ne' omogenei, anche perché le metodiche non sono standardizzate, specialmente nei

pazienti con tumore del retto sottoposti a trattamento radiochemioterapico neoadiuvante [12-15].

Un problema reale nei precedenti tentativi di validare come metodica l'uso dei linfonodi sentinella nei tumori coloretali è stato l'assenza di un braccio che, tramite le tecniche immunoistochimiche, mirasse all'ultrastadiazione dei SLN NND per la ricerca delle micrometastasi.

Chand et al hanno riportato una serie preliminare di 10 pazienti (FLICC study) con una detection rate relativamente bassa (80%), ma senza accenno ad indagini di ultrastadiazione. [45]

Riguardo il vero impatto dell'ultrastadiazione, un grande contributo è stato dato da Wiese e coll. Che, analizzando una coorte di 200 pazienti con tumore coloretale NND, hanno riportato un tasso di upstaging significativamente più alto quando applicavano le metodiche di ultrastadiazione ai linfonodi sentinella (12%), rispetto a quando applicate ai linfonodi non sentinella (upstaging di solo 1%)[8].

Rivet, invece, ha riportato una detection rate del 98% (56/57 pts), una sensitivity del 48%, una false negative e upstaging rate del 52% e 5,26% dopo mappatura dei SLN con blu isosulfano (IB). [46]

Park, nel suo studio di confronto delle tecniche di iniezione ex vivo o in vivo di colorante blu nella mappatura dei SLN per tumore coloretale, ha riportato dei tassi, seppur simili, ma a favore della tecnica ex vivo di detection (90.6 vs 81.1%), sensitivity (86.7 vs. 76.5%), FN (13.3 vs. 23.5%) and upstaging rate (21.4 vs. 15.3%) (overall US rate: 18.5%, 5/27 patients)[47].

Andersen e colleghi hanno invece confrontato le due metodiche di iniezione utilizzando coloranti diversi (in vivo con ICG ed ex vivo con blu di metilene) negli stessi pazienti per la ricerca dei SLN. Nella loro serie di 29 pazienti, gli autori hanno riportato una detection rate congiunta del 75.9%. In 7 dei pazienti arruolati, non è stato possibile identificare nessun SLN indipendentemente dalla tecnica di iniezione usata. Quando poi considerate separatamente, i tassi di detection rate scendono al 65.6% nella tecnica in-vivo e al 37.9% nella ex-vivo. Non hanno riportato micrometastasi. Da notare che Andersen ha usato un timing di riconoscimento differente: 20 minuti per la tecnica in vivo e 2 minuti per la tecnica ex vivo. Questo bias potrebbe spiegare la loro inferior detection rate quando confrontata con le altre serie pubblicate in letteratura. [48]

Weixler et al hanno confrontato la ricerca dei SLN con la tecnica in vivo (con blu isosulfano, n=170) vs la ex vivo (con HSA800 – IRDye800CW combinato con siero di albumina umana, n=50) in una serie di 220 pazienti stadio I-III. La detection rate è risultata simile in entrambi i gruppi: blu= 100% vs IRDye800CW (98%). La sensitivity, FN and US rate sono risultate del 75.3 vs. 64%, 24.7 vs. 36%, and 25.8 vs. 17.2% rispettivamente. [49]

Hirche et al hanno applicato la tecnica NIRF ICG in vivo in una serie di 26 pazienti raggiungendo una detection rate del 96% con una sensitivity rate dell'82% e un FN rate del 18%. Il tasso di upstaging è risultato essere del 16% dei pazienti con malattia linfonodale negativa (3/18 NND pts). [50]

I risultati del nostro studio sono simili a quelli riportati in letteratura e confermano la validità di questa metodologia di ricerca.

Nella nostra serie, un totale di 117 SLN (2,01 di media, range: 1-9) sono stati identificati nel 94,8% (55/58 pts), con una sensitivity rate del 100% e nessun falso negativo (vedi Tabella 3) - dimostrando l'efficacia dell'identificazione dei SLN su banco. Ogni SLN dei pazienti con malattia linfonodale negative all'esame anatomopatologico convenzionale è stato ulteriormente investigato con tecnica di ultrastadiazione.

In 4 casi di pazienti NND (14%) sono state identificate, grazie alle suddette tecniche, micrometastasi. In questi casi la stadiazione linfonodale, in accordo con l'ultima edizione del TNM AJCC Cancer Staging Manual, è passata da pN0 a pN1, rimodulando di conseguenza l'indicazione ad eventuale trattamento chemioterapico adiuvante.

SVILUPPO NUOVI FLUOROFORI

CONCLUSIONI

Questi capitoli non vengono temporaneamente riportati perché attualmente oggetto di brevetto ancora in corso.

Verranno integrati successivamente.

References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A: **Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.** *CA Cancer J Clin* 2018, **68**:394-424.
2. Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, Cederquist L, Chen YJ, Ciombor KK, Cohen S, Cooper HS, Deming D, Engstrom PF, et al: **NCCN Guidelines Insights: Colon Cancer, Version 2.2018.** *J Natl Compr Canc Netw* 2018, **16**:359-369.
3. Ong MLH, Schofield JB: **Assessment of lymph node involvement in colorectal cancer.** *World Journal of Gastrointestinal Surgery* 2016, **8**:179-192.
4. Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ, Haller DG: **Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089.** *J Clin Oncol* 2003, **21**:2912-2919.
5. Amin MB, Edge SB, American Joint Committee on Cancer: *AJCC cancer staging manual.* Eighth edition. edn. Switzerland: Springer; 2017.
6. Edge SB, American Joint Committee on Cancer.: *AJCC cancer staging manual.* 7th edn. New York: Springer; 2010.
7. Fang SH, Efron JE, Berho ME, Wexner SD: **Dilemma of stage II colon cancer and decision making for adjuvant chemotherapy.** *J Am Coll Surg* 2014, **219**:1056-1069.
8. Wiese D, Sirop S, Yestrepsky B, Ghanem M, Bassily N, Ng P, Liu W, Quiachon E, Ahsan A, Badin J, Saha S: **Ultrastaging of sentinel lymph nodes (SLNs) vs. non-SLNs in colorectal cancer--do we need both?** *Am J Surg* 2010, **199**:354-358; discussion 358.
9. van der Pas MH, Meijer S, Hoekstra OS, Riphagen, II, de Vet HC, Knol DL, van Grieken NC, Meijerink WJ: **Sentinel-lymph-node procedure in colon and rectal cancer: a systematic review and meta-analysis.** *Lancet Oncol* 2011, **12**:540-550.
10. Cahill RA, Leroy J, Marescaux J: **Localized resection for colon cancer.** *Surg Oncol* 2009, **18**:334-342.
11. D'Ambrosio G, Picchetto A, Campo S, Palma R, Panetta C, De Laurentis F, La Rocca S, Lezoche E: **Quality of life in patients with loco-regional rectal cancer after ELRR by TEM versus VLS TME after nChRT: long-term results.** *Surg Endosc* 2019, **33**:941-948.
12. Vahrmeijer AL, Hutteman M, van der Vorst JR, van de Velde CJ, Frangioni JV: **Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence.** *Nat Rev Clin Oncol* 2013, **10**:507-518.
13. Hutteman M, Choi HS, Mieog JS, van der Vorst JR, Ashitate Y, Kuppen PJ, van Groningen MC, Löwik CW, Smit VT, van de Velde CJ, et al: **Clinical translation of ex vivo sentinel lymph node mapping for colorectal**

- cancer using invisible near-infrared fluorescence light.** *Ann Surg Oncol* 2011, **18**:1006-1014.
14. Zhu B, Sevick-Muraca EM: **A review of performance of near-infrared fluorescence imaging devices used in clinical studies.** *Br J Radiol* 2015, **88**:20140547.
 15. Picchetto A, Seeliger B, La Rocca S, Barberio M, D'Ambrosio G, Marescaux J, Diana M: **[Fluorescence-guided detection of lymph node metastases of gastrointestinal tumors].** *Chirurg* 2019.
 16. Saha S, Wiese D, Badin J, Beutler T, Nora D, Ganatra BK, Desai D, Kaushal S, Nagaraju M, Arora M, Singh T: **Technical details of sentinel lymph node mapping in colorectal cancer and its impact on staging.** *Ann Surg Oncol* 2000, **7**:120-124.
 17. Saha S, Bilchik A, Wiese D, Espinosa M, Badin J, Ganatra BK, Desai D, Kaushal S, Singh T, Arora M: **Ultrastaging of colorectal cancer by sentinel lymph node mapping technique--a multicenter trial.** *Ann Surg Oncol* 2001, **8**:94S-98S.
 18. Wood TF, Saha S, Morton DL, Tsioulis GJ, Rangel D, Hutchinson W, Foshag LJ, Bilchik AJ: **Validation of lymphatic mapping in colorectal cancer: in vivo, ex vivo, and laparoscopic techniques.** *Ann Surg Oncol* 2001, **8**:150-157.
 19. Kitagawa Y, Fujii H, Mukai M, Kubota T, Ando N, Watanabe M, Ohgami M, Otani Y, Ozawa S, Hasegawa H, et al: **The role of the sentinel lymph node in gastrointestinal cancer.** *Surg Clin North Am* 2000, **80**:1799-1809.
 20. van der Pas MH, Meijer S, Hoekstra OS, Riphagen II, de Vet HC, Knol DL, van Grieken NC, Meijerink WJ: **Sentinel-lymph-node procedure in colon and rectal cancer: a systematic review and meta-analysis.** *Lancet Oncol* 2011, **12**:540-550.
 21. Schaafsma BE, Verbeek FP, van der Vorst JR, Hutteman M, Kuppen PJ, Frangioni JV, van de Velde CJ, Vahrmeijer AL: **Ex vivo sentinel node mapping in colon cancer combining blue dye staining and fluorescence imaging.** *J Surg Res* 2013, **183**:253-257.
 22. Diana M: **Enabling precision digestive surgery with fluorescence imaging.** *Transl Gastroenterol Hepatol* 2017, **2**:97.
 23. Diana M: **Fluorescence-guided surgery applied to the digestive system: the cybernetic eye to see the invisible.** *Cir Esp* 2017.
 24. Nishigori N, Koyama F, Nakagawa T, Nakamura S, Ueda T, Inoue T, Kawasaki K, Obara S, Nakamoto T, Fujii H, Nakajima Y: **Visualization of Lymph/Blood Flow in Laparoscopic Colorectal Cancer Surgery by ICG Fluorescence Imaging (Lap-IGFI).** *Ann Surg Oncol* 2016, **23 Suppl 2**:S266-274.
 25. Alander JT, Kaartinen I, Laakso A, Pätälä T, Spillmann T, Tuchin VV, Venermo M, Välisuo P: **A review of indocyanine green fluorescent imaging in surgery.** *Int J Biomed Imaging* 2012, **2012**:940585.
 26. Björnsson OG, Murphy R, Chadwick VS: **Physiochemical studies of indocyanine green (ICG): absorbance/concentration relationship, pH**

- tolerance and assay precision in various solvents.** *Experientia* 1982, **38**:1441-1442.
27. Engel E, Schraml R, Maisch T, Kobuch K, König B, Szeimies RM, Hillenkamp J, Bäuml W, Vasold R: **Light-induced decomposition of indocyanine green.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008, **49**:1777-1783.
 28. Kogure K, Choromokos E: **Infrared absorption angiography.** *J Appl Physiol* 1969, **26**:154-157.
 29. Flower RW: **Injection technique for indocyanine green and sodium fluorescein dye angiography of the eye.** *Invest Ophthalmol* 1973, **12**:881-895.
 30. Hirche C, Mohr Z, Kneif S, Doniga S, Murawa D, Strik M, Hunerbein M: **Ultrastaging of colon cancer by sentinel node biopsy using fluorescence navigation with indocyanine green.** *Int J Colorectal Dis* 2012, **27**:319-324.
 31. Diana M, Agnus V, Halvax P, Liu YY, Dallemagne B, Schlagowski AI, Geny B, Diemunsch P, Lindner V, Marescaux J: **Intraoperative fluorescence-based enhanced reality laparoscopic real-time imaging to assess bowel perfusion at the anastomotic site in an experimental model.** *Br J Surg* 2015, **102**:e169-176.
 32. Diana M, Noll E, Diemunsch P, Dallemagne B, Benahmed MA, Agnus V, Soler L, Barry B, Namer IJ, Demartines N, et al: **Enhanced-reality video fluorescence: a real-time assessment of intestinal viability.** *Ann Surg* 2014, **259**:700-707.
 33. Diana M, Dallemagne B, Chung H, Nagao Y, Halvax P, Agnus V, Soler L, Lindner V, Demartines N, Diemunsch P, et al: **Probe-based confocal laser endomicroscopy and fluorescence-based enhanced reality for real-time assessment of intestinal microcirculation in a porcine model of sigmoid ischemia.** *Surg Endosc* 2014, **28**:3224-3233.
 34. Diana M, Halvax P, Dallemagne B, Nagao Y, Diemunsch P, Charles AL, Agnus V, Soler L, Demartines N, Lindner V, et al: **Real-time navigation by fluorescence-based enhanced reality for precise estimation of future anastomotic site in digestive surgery.** *Surg Endosc* 2014, **28**:3108-3118.
 35. Blanco-Colino R, Espin-Basany E: **Intraoperative use of ICG fluorescence imaging to reduce the risk of anastomotic leakage in colorectal surgery: a systematic review and meta-analysis.** *Tech Coloproctol* 2018, **22**:15-23.
 36. Carus T, Dammer R: **Laparoscop fluorescence angiography with indocyanine green to control the perfusion of gastrointestinal anastomoses intraoperatively.** *Surg Technol Int* 2012, **22**:27-32.
 37. Agnus V, Pesce A, Boni L, Van Den Bos J, Morales-Conde S, Paganini AM, Quaresima S, Balla A, La Greca G, Plaudis H, et al: **Fluorescence-based cholangiography: preliminary results from the IHU-IRCAD-EAES EURO-FIGS registry.** *Surg Endosc* 2019.
 38. Liu YY, Liao CH, Diana M, Wang SY, Kong SH, Yeh CN, Dallemagne B, Marescaux J, Yeh TS: **Near-infrared cholecystocholangiography with**

- direct intragallbladder indocyanine green injection: preliminary clinical results.** *Surg Endosc* 2018, **32**:1506-1514.
39. Dip F, LoMenzo E, Sarotto L, Phillips E, Todeschini H, Nahmod M, Alle L, Schneider S, Kaja L, Boni L, et al: **Randomized Trial of Near-infrared Incisionless Fluorescent Cholangiography.** *Ann Surg* 2019.
40. Diana M, Robinet E, Liu YY, Legner A, Kong SH, Schiraldi L, Marchegiani F, Halvax P, Swanstrom L, Dallemagne B, Marescaux J: **Confocal Imaging and Tissue-Specific Fluorescent Probes for Real-Time In Vivo Immunohistochemistry. Proof of the Concept in a Gastric Lymph Node Metastasis Model.** *Ann Surg Oncol* 2016, **23**:567-573.
41. Yanagita S, Natsugoe S, Uenosono Y, Arigami T, Arima H, Kozono T, Funasako Y, Ehi K, Nakajo A, Ishigami S, Aikou T: **Detection of micrometastases in sentinel node navigation surgery for gastric cancer.** *Surg Oncol* 2008, **17**:203-210.
42. van Manen L, Handgraaf HJM, Diana M, Dijkstra J, Ishizawa T, Vahrmeijer AL, Mieog JSD: **A practical guide for the use of indocyanine green and methylene blue in fluorescence-guided abdominal surgery.** *J Surg Oncol* 2018, **118**:283-300.
43. Cahill RA, Anderson M, Wang LM, Lindsey I, Cunningham C, Mortensen NJ: **Near-infrared (NIR) laparoscopy for intraoperative lymphatic road-mapping and sentinel node identification during definitive surgical resection of early-stage colorectal neoplasia.** *Surg Endosc* 2012, **26**:197-204.
44. Aurello P, Petrucciani N, D'Angelo F, Nigri G, Picchetto A, Cicchini C, Maglio R, Ramacciato G: **Synchronous signet-ring cell carcinoma of the duodenum and ampullary intestinal-type carcinoma.** *Am Surg* 2011, **77**:E262-264.
45. Chand M, Keller DS, Joshi HM, Devoto L, Rodriguez-Justo M, Cohen R: **Feasibility of fluorescence lymph node imaging in colon cancer: FLICC.** *Tech Coloproctol* 2018, **22**:271-277.
46. Rivet EB, Mutch MG, Ritter JH, Khan AA, Lewis JS, Winslow E, Fleshman JW: **Ex vivo sentinel lymph node mapping in laparoscopic resection of colon cancer.** *Colorectal Dis* 2011, **13**:1249-1255.
47. Park JS, Chang IT, Park SJ, Kim BG, Choi YS, Cha SJ, Park ES, Kwon GY: **Comparison of ex vivo and in vivo injection of blue dye in sentinel lymph node mapping for colorectal cancer.** *World J Surg* 2009, **33**:539-546.
48. Andersen HS, Bennedsen ALB, Burgdorf SK, Eriksen JR, Eiholm S, Toxværd A, Riis LB, Rosenberg J, Gögenur I: **In vivo and ex vivo sentinel node mapping does not identify the same lymph nodes in colon cancer.** *Int J Colorectal Dis* 2017, **32**:983-990.
49. Weixler B, Rickenbacher A, Raptis DA, Viehl CT, Guller U, Rueff J, Zettl A, Zuber M: **Sentinel Lymph Node Mapping with Isosulfan Blue or Indocyanine Green in Colon Cancer Shows Comparable Results and**

- Identifies Patients with Decreased Survival: A Prospective Single-Center Trial.** *World J Surg* 2017, **41**:2378-2386.
50. Hirche C, Mohr Z, Kneif S, Doniga S, Murawa D, Strik M, Hünnerbein M: **Ultrastaging of colon cancer by sentinel node biopsy using fluorescence navigation with indocyanine green.** *Int J Colorectal Dis* 2012, **27**:319-324.