

Dottorato di Ricerca
TECNOLOGIE AVANZATE IN CHIRURGIA

Dipartimento Scienze Chirurgiche

Facoltà di Medicina ed Odontoiatria

SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA



Cellule Tumoriali Circolanti nella Chirurgia del
Distretto Testa-Collo:
Studio Prospettivo Comparativo Pre- e Post-
Operatorio con Tecnologia ScreenCell®

Relatore
Prof. Antonio GRECO

Candidata
Dott.ssa Maria Ida RIZZO

A/A 2015-2016

Ringrazio il Chiar.mo Prof. Marco de Vincentiis e il Chiar.mo Prof. Antonio Greco per la fiducia accordatami e per aver creduto e investito nel progetto.

Ringrazio la dott.ssa Annapina Palmieri per l'amicizia e la collaborazione.

Ringrazio mio marito e mio figlio per il supporto amorevole.

Ringrazio i miei genitori per avermi insegnato a guardare sempre con fiducia verso il nuovo e ad affrontare con coraggio e risolutezza ogni nuova sfida.

INDICE

1. INTRODUZIONE	4
1.1. Obiettivo dello studio	4
1.2. Generalità sulle cellule tumorali circolanti (CTCs) e tecnologie di ricerca	7
1.3. Generalità sul carcinoma della laringe	10
2. MATERIALI E METODI	17
2.1. Campionamento dei Pazienti	17
2.2. Studio Prospettico e Flow-Chart	21
2.3. Tecnologia Screen Cell [®] e Marcatori utilizzati	23
2.4. Studio Statistico	28
3. RISULTATI	29
3.1. Analisi Statistica	29
3.1.1. Interpretazione dei Dati Preoperatori	36
3.1.2. Interpretazione dei Dati Postoperatori a Breve termine	37
3.1.3. Interpretazione dei Dati Postoperatori a Medio termine	38
3.1.4. Interpretazione dei Dati Postoperatori a Lungo termine	39
3.2. Microscopia	40
4. DISCUSSIONE	44
5. CONCLUSIONI	49
Bibliografia	52

INTRODUZIONE

1.1. Obiettivo dello studio

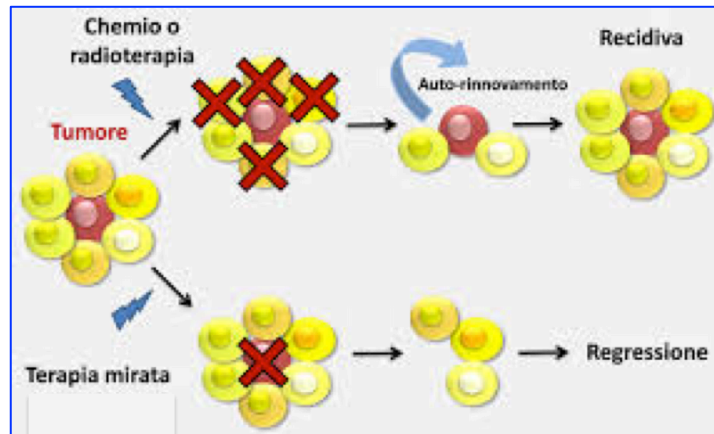
Nel trattamento oncologico dei tumori maligni del distretto testa-collo, TNM è l'unico sistema prognostico utilizzato. Esso crea classi di rischio con prognosi diversa, ma con alta variabilità del rischio all'interno delle singole classi, risultando uno strumento prognostico non ottimale a livello del singolo paziente. [1, 2]

Risulta pertanto urgente la necessità di identificare nuovi fattori prognostici al fine di migliorare i metodi di trattamento.

La presente attività di ricerca si inserisce nel quadro della medicina sperimentale e molecolare. Il fine verso cui si tende è esplorare i meccanismi di origine, invasione e metastasi del carcinoma laringeo attraverso lo studio delle cellule tumorali presenti nel torrente circolatorio (CTCs, Circulating Tumor Cells).

Queste cellule sono definite la “benzina” dei tumori e si moltiplicano gli studi internazionali e le evidenze scientifiche della presenza di CTCs in molti tumori solidi (mammella, colon, prostata).

Lo studio di queste cellule apre un campo scientifico molto promettente nella ricerca contro il cancro, poiché i pazienti potrebbero beneficiare di nuovi mezzi prognostici e, nel futuro, di nuove strategie terapeutiche che le inibiscono o che le colpiscono direttamente. [3]



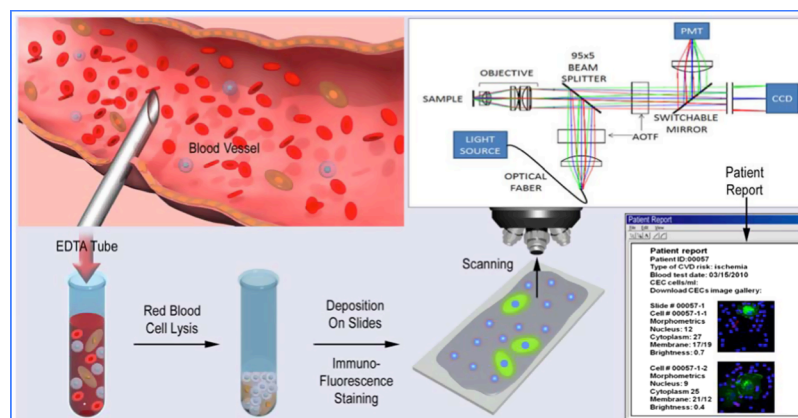
Studiare le CTCs nel sangue periferico dei pazienti con tumori solidi, permetterà di individuare fattori prognostici indipendenti, in modo da rendere migliore la stratificazione del rischio e di conseguenza la cura dei pazienti, con particolare riguardo alla selezione dei pazienti da trattare con terapia adiuvante.

L'obiettivo dello studio è ricercare la presenza delle CTCs nel sangue periferico di pazienti con carcinoma laringeo nel pre e nel postoperatorio e caratterizzarle.

E' stato disegnato a tal fine uno studio prospettico comparativo pre- e post-operatorio in campionando un gruppo omogeneo di pazienti con diagnosi di carcinoma laringeo squamocellulare in attesa di chirurgia primaria non sottoposti a terapia neo-adiuvante.

La tecnologia d'indagine scelta per l'identificazione delle CTCs è il sistema ScrenCell.

Prima di procedere al campionamento finalizzato alla ricerca e comparazione pre- e postoperatoria, è stato eseguito un test preliminare per validare il metodo selezionato. Per il test preliminare sono stati



arruolati tre pazienti già operati per carcinoma laringeo squamocellulare, con assenza di malattia clinicamente rilevabile in seguito al trattamento chirurgico. La tecnologia ScreenCell ha permesso di individuare CTCs in tutti e tre i pazienti in esame, con una marcata positività e una specificità maggiore rispetto alla metodica di ricerca delle CTCs attualmente utilizzata dalla maggior parte dei team di ricerca nel mondo (Cell Search System[®]), compresi i carcinomi del distretto testa-collo.

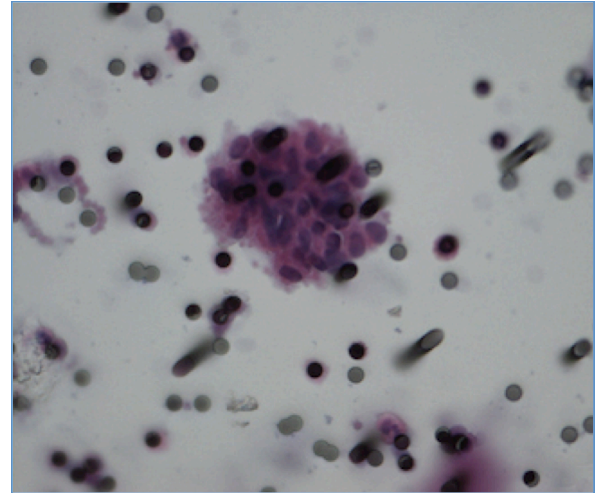
Il buon esito del test preliminare, che ha dimostrato che i pazienti con carcinoma laringeo squamocellulare presentano CTCs nel sangue periferico e che sono evidenziabili con tecnologia ScreenCell, ha aperto la strada al campionamento e dato lo start alla ricerca pre- e postoperatoria. Il campione dei pazienti è stato reclutato in base a specifici criteri di inclusione ed esaminato prima e dopo l'asportazione chirurgica del tumore per osservare la presenza e le variazioni delle CTCs nel sangue periferico.

Per lo studio CTCs nel carcinoma laringeo, è stato creato un team di ricerca composto da ricercatori del Dipartimento di Organi di Senso, del Dipartimento di Medicina Molecolare e del Dipartimento di Anatomia Patologica dell'Università degli Studi La Sapienza di Roma.

Nella presente tesi vengono presentati i risultati pre- e post-operatori a breve (3 mesi), medio (6 mesi) e lungo termine (12 mesi); vengono esaminate le differenze tra le CTCs rilevate nel pre- e nel postoperatorio; viene presentata, infine, un'analisi sulla correlazione tra la presenza di CTCs e la risposta terapeutica e la sopravvivenza libera da malattia.

1.2. Generalità sulle cellule tumorali circolanti (CTCs) e tecnologie di ricerca

Nei pz che sviluppano recidiva o metastasi, la malattia si sviluppa a partire da microscopici residui del tumore noti come malattia minima residua (MRD). Questa può coinvolgere, tra gli altri compartimenti, linfonodi, midollo spinale e sangue periferico.



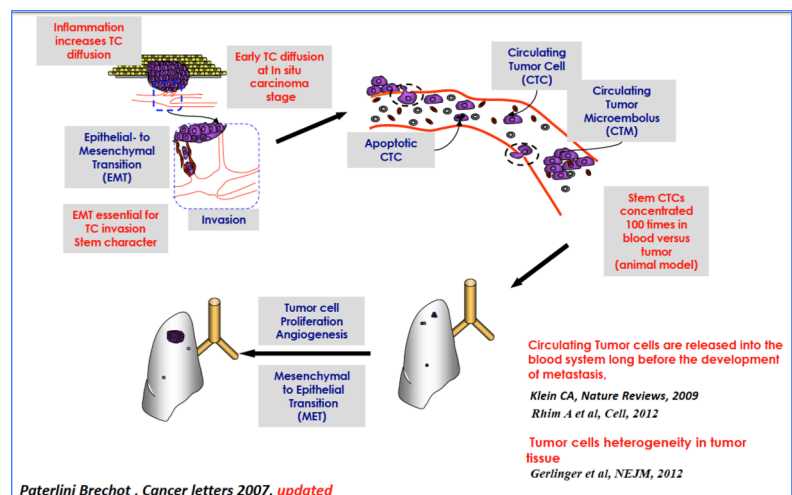
La ricerca della MRD nel sangue periferico è condotta di routine per le neoplasie ematologiche, dato che il sangue è l'ambiente fisiologico per questi tumori.

Di contro il significato biologico delle cellule tumorali circolanti (CTCs, *Circulating Tumor Cells*) nei tumori solidi è oggetto di attenzione scientifica solo di recente.

E' stimato che 1 grammo di tumore può rilasciare 1×10^6 cellule tumorali/giorno nel sangue periferico.

Una percentuale significativa di CTCs apoptotiche, quindi, non è in grado di colonizzare organi

secondari. Il che vuol dire, verosimilmente, che i tumori contengono diverse sottopopolazioni cellulari con diverso potenziale metastatico. [4]



Gli studi sulle CTCs porteranno ad una migliore comprensione della biologia tumorale, nonché al miglioramento delle strategie diagnostiche e terapeutiche. [5]

L'identificazione e il ruolo delle cellule circolanti (CTC) nelle neoplasie solide è comunque uno degli argomenti più complessi e

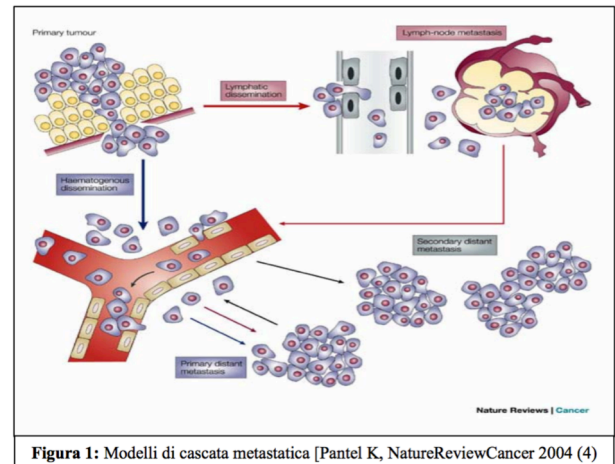
dibattuti dell'oncologia moderna. [6] Da molti anni, infatti, molti ricercatori stanno tentando non solo di individuare la migliore metodica per identificare le CTC tra le molte possibili, ma anche e, soprattutto, di chiarire l'impatto clinico relativo al riscontro di CTC in diversi stadi e fasi di malattia.

Le CTC possono derivare sia dalla neoplasia primitiva sia dalle metastasi e possono essere costituite non solo da cellule epiteliali, ma anche da cellule in transizione da epiteliale a mesenchimale (epithelial mesenchymal transition, EMT) e cellule staminali. L'identificazione dei diversi sottogruppi risulta naturalmente fondamentale ai fini di stabilirne l'esatta l'influenza nel decorso della malattia tumorale.

Nella loro revisione critica della letteratura disponibile Hardingham e Collaboratori hanno preso in esame quanto noto e pubblicato nelle neoplasie del colon-retto. In queste neoplasie l'identificazione e caratterizzazione di CTC potrebbe avere un rilievo clinico sia nella fase precoce di malattia dopo resezione radicale di neoplasia colica localmente diffusa sia nella fase di diffusione metastatica. [6]

Tipi di Cellule tumorali circolanti: [7-9]

1. *CTCs positive per citocheratine (CK+)*, sono generalmente cellule tumorali con un nucleo intatto che esprimono citocheratine a dimostrazione della loro origine epiteliale; l'assenza di



CD45, dimostra che la cellula non è di origine ematopoietica; spesso sono cellule più grandi di forma irregolare.

2. *CTCs negative per citocheratine (CK-)*, possono essere le CTC più resistenti, staminali o in transizione e più inclini a metastasi; non esprimono né le citocheratine né il CD45; possono avere una morfologia simile ad una cellula tumorale; hanno geni o esprimono proteine tumorali.

3. *CTCs apoptotiche*, sono CTC tradizionali che sono in fase di apoptosi (morte cellulare): la metodica della Epic Sciences identifica la frammentazione nucleare (carioressi) o i corpi apoptotici (blebbing) associati con l'apoptosi.

4. *CTCs "piccole"*, sono positive per le citocheratine e negative per CD45 ma hanno dimensioni e forme simili alle cellule bianche del sangue. Le CTC piccole hanno biomarcatori tumore specifici che le identificano. Le CTC piccole possono essere implicate nella progressione di malattia e nella differenziazione in carcinomi a piccole cellule.

5. *Clusters*, sono due o più CTC individuali legate insieme. Il cluster di CTC può contenere CTC tradizionali, piccole o CK-. Questi cluster hanno biomarcatori tumore specifici che li identificano. I cluster possono essere associati ad una prognosi infausta.

1.3. Generalità sul carcinoma della laringe

Le patologie laringee rimangono una significativa causa di morbilità e mortalità in tutto il mondo, in modo particolare, il carcinoma della laringe rappresenta una tra le più aggressive neoplasie maligne del distretto testa-collo, la sua incidenza aumenta di anno in anno. [10-13]. Si registrano infatti 156.877 nuovi casi/aa e 83.376 morti/aa nel mondo (*WHO, International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012*). Grazie alla chirurgia laringea e alla chemio-radioterapia, i pz hanno un tasso di sopravvivenza superiore a 5 aa, ma il 30-40% muore ancora di recidiva o metastasi [10, 14, 15] nonostante l'approccio terapeutico combinato di chirurgia laringea e chemio-radioterapia.

I pazienti con carcinoma avanzato e migliore prognosi *quoad vitam*, non hanno una buona prognosi *quoad validitatem* poiché sottoposti a laringectomia totale e tracheostomia permanente, con severe alterazioni delle funzioni di fonazione, respirazione e deglutizione; comorbilità fino alla broncopneumopatia cronica ostruttiva; riduzione della qualità di vita, difficoltà relazionali, di reinserimento sociale e lavorativo. Pertanto, il carcinoma laringeo riduce significativamente la qualità di vita e causa un'importante spesa per la sanità pubblica. [13]

Il cancro della laringe rappresenta il 60% di tutti i carcinomi della testa e del collo. Colpisce più frequentemente il sesso maschile (4:1). L'età di insorgenza è generalmente compresa fra i 40 ed i 70 anni. In Italia negli ultimi 90 anni, il numero di casi/anno è aumentato di 9 volte e l'incidenza risulta pari a 7000 nuovi casi l'anno con una maggiore frequenza in Veneto, Piemonte, Toscana e Campania.

Fattori predisponenti per il cancro della laringe sono: il fumo, l'alcool, l'abuso vocale, l'inalazione di polveri, gas o inquinanti (es.: anidride arseniosa, ossido di carbonio, benzopirene). Secondo studi recenti il rischio di morire per cancro della laringe nei pazienti fumatori è 6,98

volte maggiore nei fumatori che nei non fumatori 1,5 e tale rischio sale a 8,9 nella fascia d'età compresa tra i 69 e i 79 anni.

Anche i fattori climatici e ambientali risultano implicati nell'eziopatogenesi. È noto infatti che gli abitanti delle aree maggiormente industrializzate manifestano un'incidenza di carcinoma della laringe 2-3 volte superiore a quella delle popolazioni rurali dello stesso paese. Indici record (18,4 casi/100.000 abitanti) sono presenti nella provincia di Chiang Mai nel nord della Thailandia dove il carcinoma della laringe rappresenta la neoplasia più frequente nella popolazione.

Riguardo i fattori razziali, non esistono popolazioni immuni dal cancro della laringe e le differenze riportate dalla letteratura sembrano più legate ad abitudini tipiche della razza o del gruppo religioso che a fattori strettamente genetici. Nei Mormoni dell'Utah, in cui l'uso del fumo è proibito per motivi religiosi il cancro della laringe è praticamente sconosciuto.

Istologicamente il cancro della laringe è costituito dal carcinoma squamocellulare (epidermoidale o spinoso o malpighiano) nel 90% dei casi. Il carcinoma indifferenziato incide nell'ordine del 3-5%. Meno frequenti sono il carcinoma verrucoso, a cellule fusiformi, basaloide, adenoido cistico, muco epidermoide, adenosquamoso, carcinoide, a piccole cellule, sarcomi, istiocitoma, leiomioma, emangiopericitoma, tumori secondari, linfomi maligni non Hodgkin, condro-sarcomi, adenocarcinomi, rabdomiosarcomi. [16]

Macroscopicamente la neoplasia può presentare carattere: vegetante (42%), infiltrativo (38%), ulcerativo (20%). In rapporto alla localizzazione si distinguono tumori sopraglottici (35%), glottici (60%), sottoglottici (2-3%) e ipofaringei che insorgono nel 95% dei casi nel seno piriforme con possibile estensione alla laringe. La laringe in rapporto alle strutture che la compongono può essere infatti distinta in sopraglottica (comprendente la parte di laringe al di sopra delle corde vocali), glottica (limitata alle due corde vocali), sottoglottica (comprendente la

parte di laringe compresa tra le corde vocali vere ed il margine inferiore della cartilagine cricoidea).

La fase diagnostica delle neoplasie laringee deve prevedere un'attenta valutazione delle vie aerodigestive superiori e delle stazioni linfonodali del collo. Una laringoscopia indiretta, o meglio una diretta con fibre ottiche, consentono una buona visione del primo tratto. La TC con mezzo di contrasto del collo consente di valutare l'estensione della lesione nelle porzioni intra- e paralaringee. Evidenzia inoltre l'eventuale diffusione alle stazioni linfonodali del collo. Nelle lesioni iniziali cordali pure con estensione limitata, l'ispezione con fibroscopia, la biopsia della lesione e la palpazione del collo possono essere considerate sufficienti. Nei casi dubbi si può procedere a valutazione ecografica del collo.

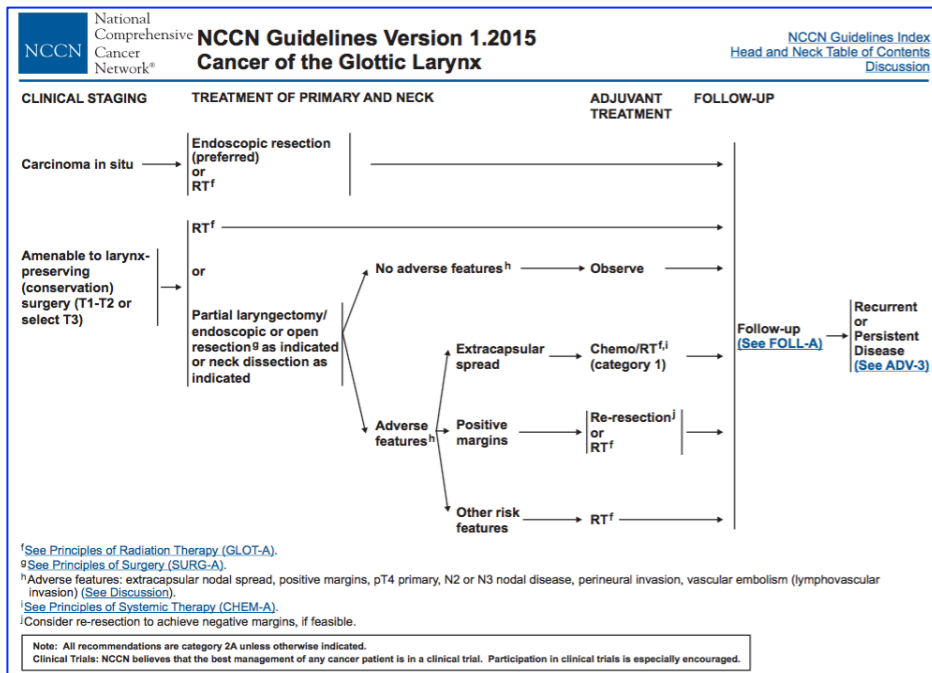
Classificazione TNM e Stadiazione dei tumori della laringe (UICC, AJCC 2002):

T	
Tx	Tumore primitivo non definibile
T0	Tumore primitivo non evidenziabile
Tis	Carcinoma in situ
Sovraglottide	
T1	Tumore limitato a una sola sottosedede della sovraglottide, con motilità normale delle corde vocali.
T2	Il tumore invade la mucosa di più di una delle sottosededi adiacenti della sovraglottide o della glottide o regioni esterne alla sovraglottide (ad esempio mucosa della base della lingua, vallecchia, parete mediale del seno piriforme) senza fissazione della laringe
T3	Tumore limitato alla laringe con fissazione della corda vocale e/o invasione di una qualsiasi delle seguenti strutture: area post-cricoaidea, tessuti pre-epiglottici, spazio paraglottico, e/o minima erosione cartilaginea
T4a	Il tumore invade la cartilagine tiroidea e/o si estende nei tessuti extra-laringei (es. trachea, tessuti molli del collo, inclusi i muscoli estrinseci della lingua, muscoli pretiroidei, tiroide o esofago).
T4b	Il tumore invade lo spazio prevertebrale, ingloba la carotide o invade le strutture mediastiniche
Glottide	
T1	Tumore limitato alla(e) corda(e) vocale(i) (può coinvolgere la commissura anteriore o quella posteriore) con normale motilità
T1a	Lesione di una sola corda vocale
T1b	Lesione di entrambe le corde vocali
T2	Il tumore si estende alla sovraglottide e/o alla sottoglottide, e/o con compromissione della mobilità delle

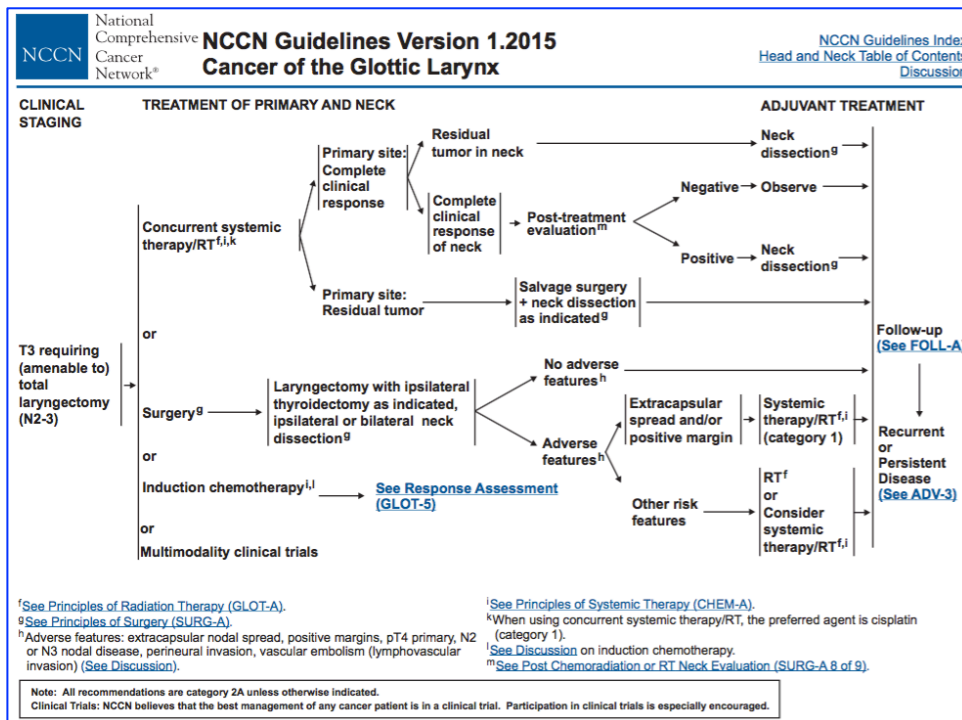
	corde vocali
T3	Tumore limitato alla laringe con fissazione delle corde vocali e/o invade lo spazio paraglottico e/o presenta minima erosione cartilaginea
T4a	Il tumore invade la cartilagine tiroidea e/o si estende nei tessuti extra-laringei (es. trachea, tessuti molli del collo inclusi i muscoli estrinseci della lingua, muscoli pre-tiroidei, tiroide, esofago)
T4b	Il tumore invade lo spazio prevertebrale, ingloba la carotide o invade le strutture mediastiniche
Sottoglottide	
T1	Tumore limitato alla sottoglottide.
T2	Il tumore si estende a una o entrambe le corde vocali, con mobilità normale o compromessa
T3	Tumore limitato alla laringe con fissazione delle corde vocali
T4a	Il tumore invade la cartilagine tiroidea e/o si estende nei tessuti extra-laringei (es. trachea, tessuti molli del collo, inclusi i muscoli estrinseci della lingua, muscoli pretiroidei, tiroide o esofago).
T4b	Il tumore invade lo spazio prevertebrale, ingloba la carotide o invade le strutture mediastiniche
N	
Nx	Linfonodi regionali non valutabili
N0	Linfonodi regionali liberi da metastasi
N1	Metastasi in 1 solo linfonodo omolaterale di dimensione massima uguale o inferiore a 3 cm.
N2	Metastasi in 1 solo linfonodo omolaterale di dimensione max tra 3 e 6 cm; in più linfonodi omolaterali o controlaterali, nessuno dei quali abbia dimensione max > 6 cm
N2a	Metastasi in un solo linfonodo omolaterale di dimensione massima fra 3 e 6 cm
N2b	Metastasi in linfonodi omolaterali, nessuno dei quali abbia dimensione massima superiore a 6 cm
N2c	Metastasi in linfonodi bilaterali o controlaterali, nessuno dei quali abbia dimensione massima > 6 cm
N3	Metastasi in qualsiasi linfonodo di dimensione massima superiore a 6 cm
Stadi	
0	T1s N0 M0
I	T1 N0 M0
II	T2 N0 M0
III	T1/T2 N1 M0 oppure T3 N0/N1 M0
IVA	T1/T2/T3 N2 M0 oppure T4a N0/N1/N2 M0
IV B	Ogni T N3 M0 oppure T4b Ogni N M0
IV C	Ogni T Ogni N M1

Il trattamento chirurgico dipende da molti fattori che comprendono la localizzazione del tumore, lo stadio della malattia e le esigenze del paziente. [17] La malattia in fase avanzata localmente o regionalmente può essere trattata con la chirurgia seguita da radioterapia adiuvante, con radioterapia, da sola o con radioterapia e chemioterapia concomitanti. [18]

Linee guida 2015 del National Comprehensive Cancer Network per i carcinomi glottici non avanzati:



Linee guida 2015 del National Comprehensive Cancer Network per i carcinomi glottici avanzati:



Linee guida pubblicate nel 2008 dalla Società Italiana di Otorinolaringoiatria e Chirurgia Cervico-Facciale in collaborazione con il Dipartimento di Organi di Senso del Policlinico Umberto I di Roma:

<i>Tumori sovraglottici</i>	Laser C02	Chir. conservativa	RT	RT+CT	LT
T1	XXX	X	X		
T2	XXX	XX	X		
T3 aritenoide mobile	XX	XXX		XX	
T3 aritenoide fissa		X		XXX	XX
T4a (senza invasione cartilagini)		X		XXX	XXX
T4a (con invasione cartilagini)				X	XXX

<i>Tumori glottici</i>	Laser C02	Chir. conservativa	RT	RT+CT	LT
T1a	XXX		XX		
T1b	XX	XX	XXX		
T2	XX	XXX	XX	X	X
T3 aritenoide mobile	X	XXX	X	XX	
T3 aritenoide fissa		X		XXX	XX
T4a (senza invasione cartilagini)		X		XX	XXX
T4a(con invasione cartilagini)				X	XXX

<i>Tumori sottoglottici</i>	RT	RT+CT	LT
T1-2	X		
T3		XXX	XX
T4a		XX	XXX

<i>Chirurgia di recupero dopo recidiva a RT: Tumori glottici</i>	Laser C02	Chir. conservativa	LT
r-T1a	XXX	X	
r-T1b	XXX	XX	
r-T2	XX	XXX	XX
r-T3		X	XXX
r-T4a (senza invasione cartilagini)		X	XXX
r-T4a (con invasione cartilagini)			XXX

Diverse tecniche chirurgiche sono state sviluppate per il trattamento del carcinoma laringeo secondo la fase della malattia e la sede del tumore. [19, 20]

Queste tecniche possono essere descritte sotto una classificazione generica di laringectomia parziale o totale. La laringectomia totale determina una completa perdita della funzione vocale, la laringectomia parziale invece

Conservative procedures
Endoscopic laser excision and cordectomy
Vertical partial laryngectomy
Frontolateral laryngectomy
Hemilaryngectomy
Horizontal laryngectomy
Supraglottic
Extended supraglottic
Three-quarters
Supracricoid
With cricothyroidopexy (CHP o Labayle)
With cricothyroidoepiglottopexy (CHEP o Majer Piquet)
Near total laryngectomy
Radical procedure
Total laryngectomy

comporta la conservazione di una porzione della laringe vocale in modo che i suoni possano essere prodotti e la respirazione possa essere conservata in genere senza una tracheotomia. [21]

Diverse procedure chirurgiche possono essere utilizzate per rimuovere il cancro mantenendo o ricostruendo nel contempo le strutture della laringe per consentire di mantenere le funzioni laringee nella respirazione, nella deglutizione e nella fonazione. [22]

Le lesioni più adatte per la chirurgia conservativa laringea (asportazione parziale della laringe) sono quelle che, a causa della loro invasività locale o della vicinanza alla cartilagine, non sono facilmente curabili con le radiazioni, ma sono sufficientemente piccole per consentire un'adeguata resezione senza sacrificare l'intera laringe. La laringectomia parziale inoltre può essere un trattamento sicuro ed efficace per casi selezionati di cancro early-stage, recidivo o persistente ad una radioterapia primaria. La laringectomia totale (asportazione radicale della laringe) viene invece considerata un trattamento di riserva come ultima opzione per il salvataggio dei pazienti. [23, 24]

2. MATERIALI E METODI

2.1. Campionamento dei Pazienti

La ricerca clinica di cui tratta il presente studio sperimentale, è condotta su un campione di soggetti selezionati da una popolazione ampia. La popolazione di interesse è rappresentata da soggetti affetti da carcinoma laringeo in attesa di intervento chirurgico.

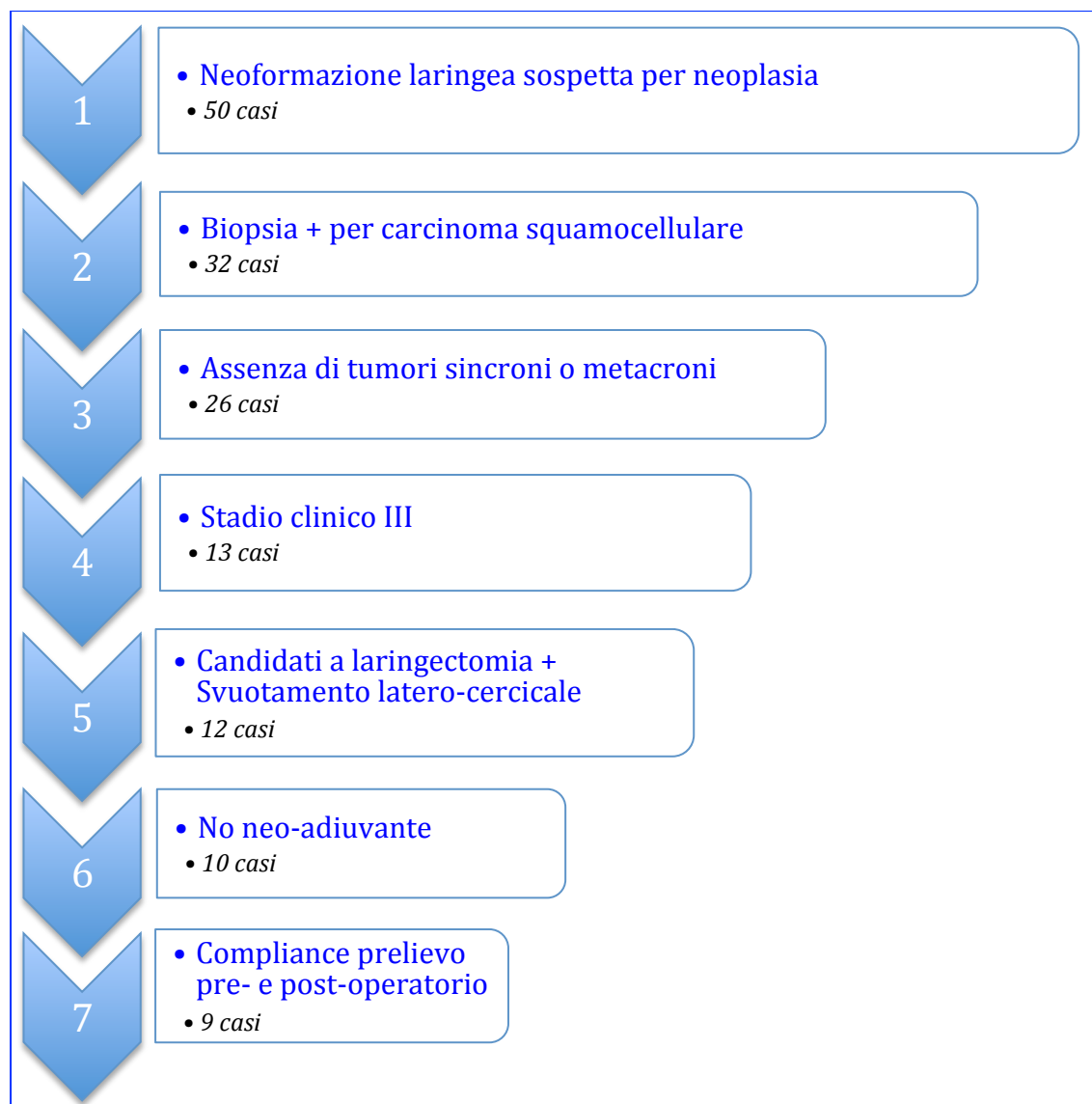
All'interno di questa popolazione è stato effettuato un campionamento sulla base di specifici criteri di inclusione, che hanno condotto alla selezione di 10 pazienti seguendo un metodo di ricerca lineare.

I criteri di inclusione stabiliti per eleggere il campione di studio sono stati inquadrati con i criteri della ricerca sequenziale, ovvero mediante un algoritmo che controlla in sequenza crescente gli elementi scelti per il reclutamento:

1. Pz con neoformazione laringea di natura da determinare in attesa di biopsia per sospetto carcinoma laringeo;
2. Diagnosi biptica positiva per carcinoma della laringe di tipo squamocellulare;
3. Assenza di tumori maligni sincroni o metacroni;
4. Stadio clinico III;
5. Candidati a laringectomia totale o subtotale e linfadenectomia latero-cervicale mono- o bilaterale;
6. Non candidati a terapie neo-adiuvanti.
7. Consenzienti al reclutamento nello studio sperimentale e al prelievo di sangue da destinare alla ricerca in fase pre e post-operatoria.

Si definisce come principale vantaggio di un algoritmo di campionamento sequenziale o lineare, il fatto che un elemento in sé non è sufficiente a creare un criterio di inclusione ma tutti i dati devono essere verificati fino all'ultimo criterio. Il campo di azione è di conseguenza molto ristretto ma il campione è assolutamente omogeneo con significativa riduzione dei *bias*.

Campionamento



Rappresentazione grafica semplificata del restringimento della popolazione di interesse mediante l'algoritmo di campionamento sequenziale per ottenere un campione omogeneo

Da un campione di 50 casi, sono stati reclutati 9 pazienti affetti da carcinoma squamoso della laringe, diagnosticato mediante biopsia eseguita in microlaringoscopia, in attesa di eseguire un intervento chirurgico di laringectomia primaria con intento curativo.

Casistica

Caso	Paziente	Sex	Età	Stadio Clinico	Fumatore	Alcolista	Pregressi K
1	RM	M	86	III (T3/4 N+M0)	X	–	–
2	DA	M	60	III (T3/4 N+M0)	X	–	–
3	DF	M	72	III (T2/3 N+ M0)	X	–	–
4	CB	M	73	III (T2/3 N+ M0)	X	–	–
5	DL	M	74	III (T3 N+ M0)	X	–	–
6	VA	M	66	III (T3 N+ M0)	X	–	–
7	SA	M	68	III (T3 N+ M0)	X	–	–
8	UA	M	56	III (T3 N+ M0)	X	–	–
9	RG	M	70	III (T3 N+ M0)	X	–	–

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un esame TC testa, collo, torace con mezzo di contrasto e sono stati stadiati dopo una fibrolaringoscopia e la microlaringoscopia.

Tutti i pazienti avevano uno stadio clinico III. Nessun paziente aveva neoplasia maligne sincrone o metacrone, nè era candidato a terapie neo-adiuvanti, come da criteri di inclusione.

La sperimentazione si è svolta grazie alla collaborazione dei Dipartimenti di Organi di Senso, Medicina Sperimentale e Anatomia Patologica.

2.2. Studio Prospettico e Flow-Chart

Questo studio prospettico è il primo in letteratura che rileva e caratterizza le CTCs in pazienti affetti da carcinoma della laringe primitivo, comparandole nel pre- e postoperatorio utilizzando la tecnologia ScreenCell[®]. Si tratta di una nuova metodica basata sulla filtrazione cellulare che consente di individuare le CTCs in virtù delle caratteristiche morfologiche. Le CTCs sono di maggiori dimensioni rispetto alle cellule del sangue. E' pertanto possibile isolarle su un substrato perforato con micropori. Le analisi citologiche e molecolari delle cellule selezionate permettono la loro identificazione sulla base dei classici criteri citologici di malignità e della positività a determinati marcatori molecolari.

Lo *Study Design* prevedeva 6 fasi: l'arruolamento di un gruppo omogeneo di pazienti con diagnosi di carcinoma laringeo di tipo squamocellulare; il prelievo di 10 ml/paziente di sangue periferico una settimana prima dell'intervento; l'intervento di demolizione oncologica; il prelievo di 10 ml/paziente di sangue periferico nel follow-up a breve termine, stabilito a 3 mesi; il prelievo di 10 ml/paziente di sangue periferico nel follow-up a medio termine, stabilito a 6 mesi; il prelievo di 10 ml/paziente di sangue periferico nel follow-up a lungo termine, stabilito a 12 mesi; l'analisi dei dati e pubblicazione dei risultati.

Il campione ematico (raccolto in provette di EDTA dipotassico) è stato processato entro 3 ore dal prelievo mediante kit cyto (per la caratterizzazione citologica) ed MB (per la caratterizzazione molecolare) e sono stati ricercati i seguenti marcatori tramite analisi immunocitochimica: Citocheratine 8-18-19 (CK8-18-19), che sono proteine normalmente espresse sulle cellule epiteliali (comprese quelle tumorali) e non espresse nelle cellule del sangue; la Epithelial cell adhesion molecule (EpCam) anch'essa espressa sulle cellule epiteliali ma non sulle cellule del sangue e la β -catenina coinvolta nella transizione epitelio mesenchimale e nell'acquisizione di caratteri staminali da parte delle cellule tumorali.

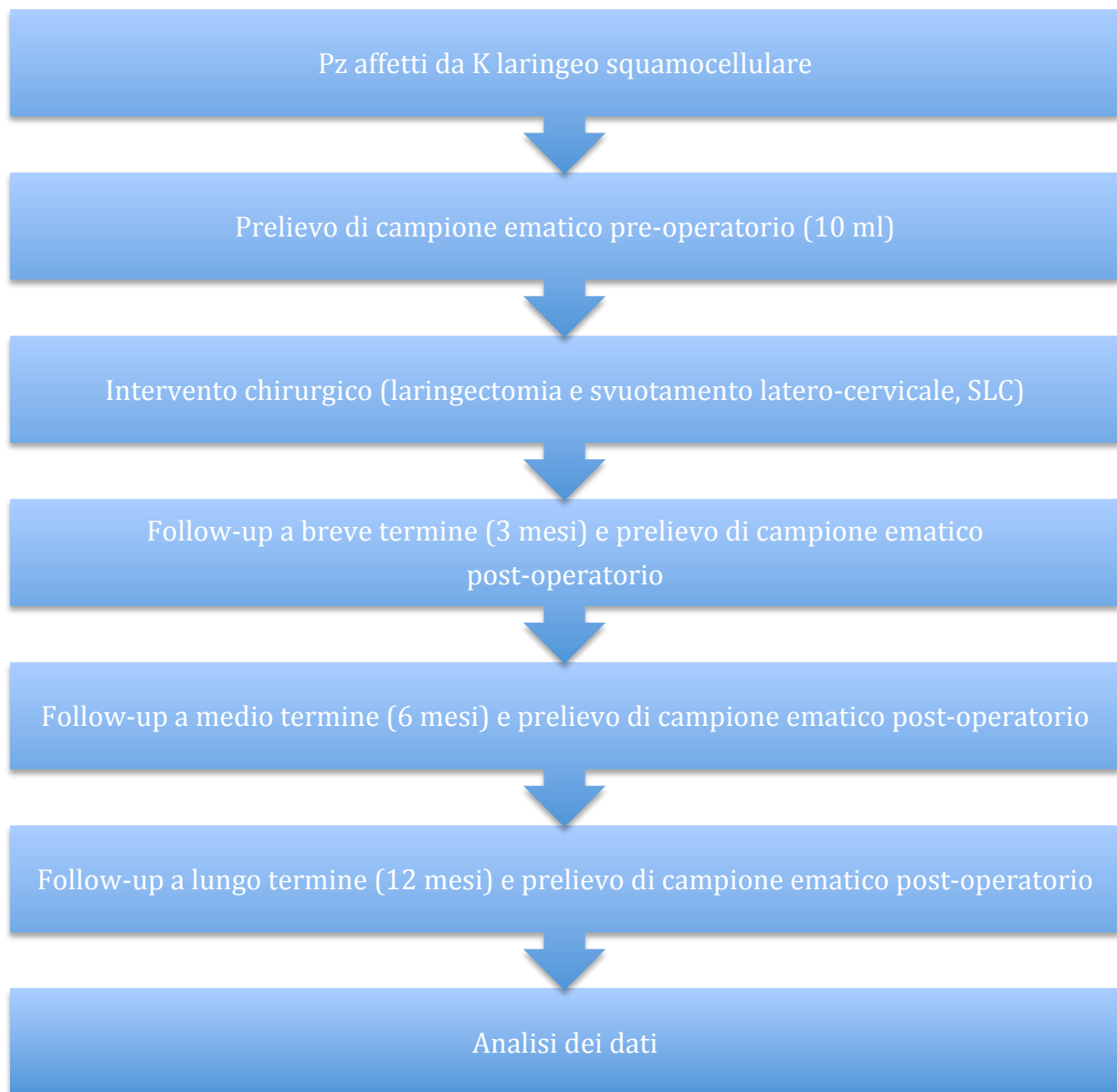
Tale procedura è stata eseguita con gli stessi criteri nel pre- e nel postoperatorio.

Per tutti i pazienti era stata pianificata una laringectomia totale o parziale con svuotamento laterocervicale mono- o bilaterale a scopo curativo.


Sono stati registrati tutti gli eventi che si sono verificati dopo l'intervento chirurgico.

La decisione riguardante la terapia adiuvante (radioterapia e/o chemioterapia postoperatoria) è stata presa da un team multidisciplinare (*Tumor Board del Policlinico Umberto I di Roma*) considerando i risultati istologici e i desideri del paziente.


Flow-Chart



2.3. Tecnologia Screen Cell[®] e Marcatori utilizzati



Screen Cell Circulating Tumor Cell device

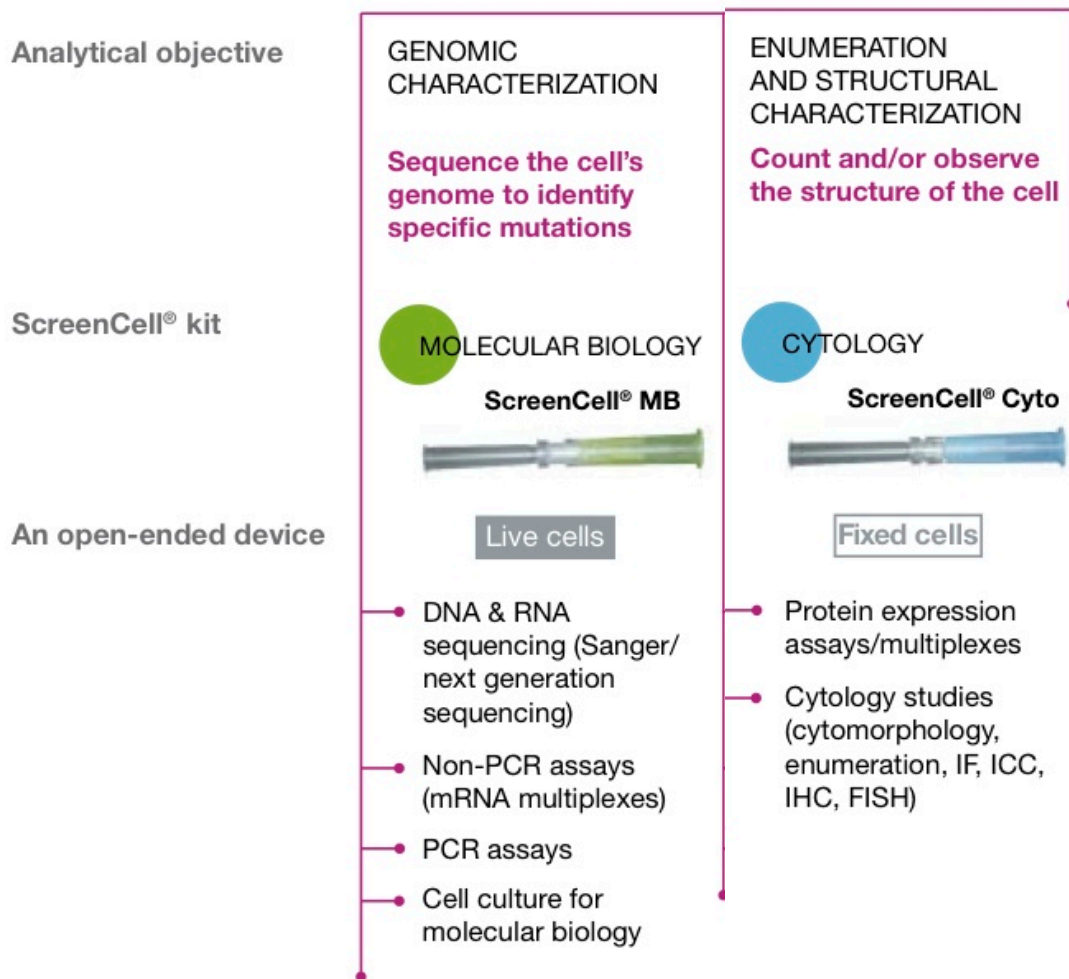


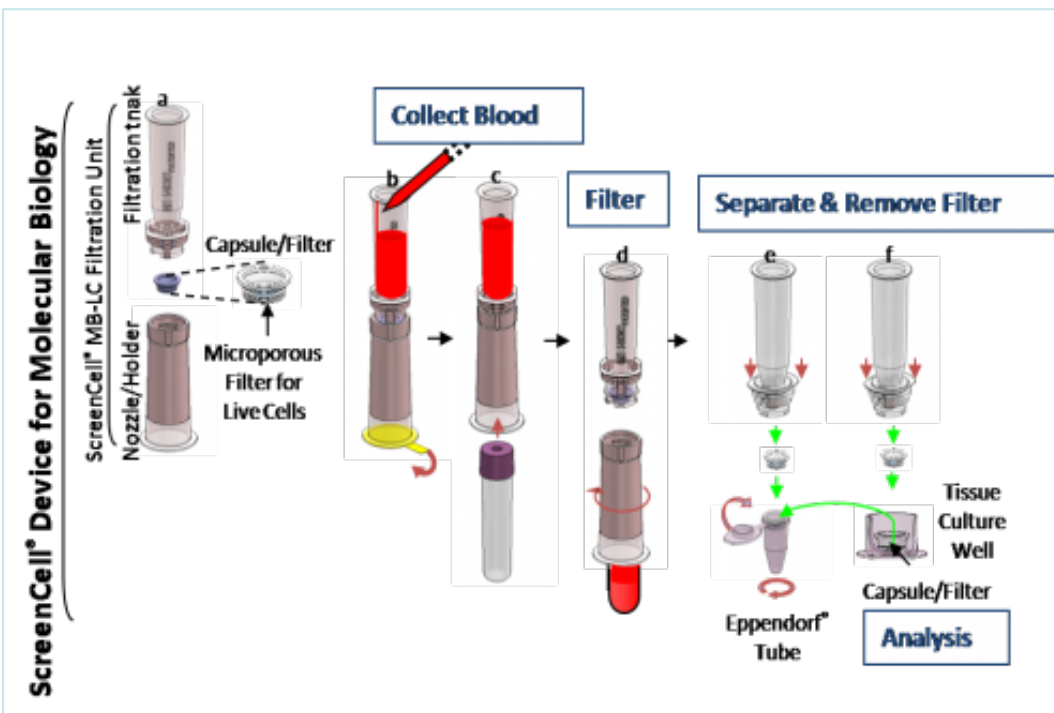
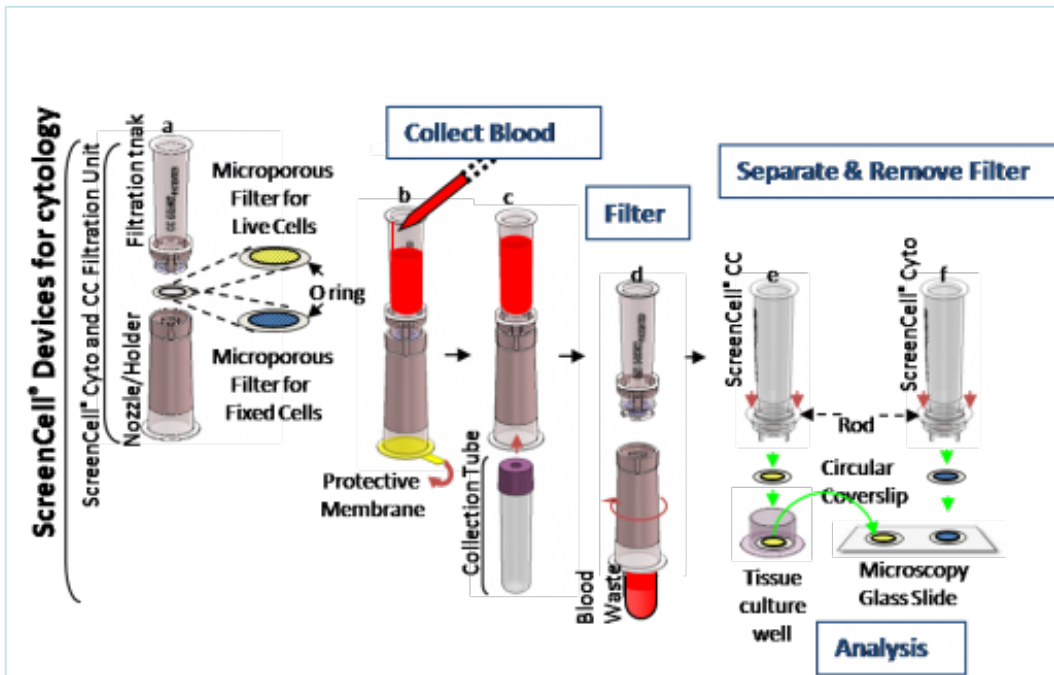
- Screen Cell Circulating Tumor Cell (CTC) device is a blood collection kit that filters CTC's from a blood sample
- CTC's can then be analyzed with ICE COLD-PCR for DNA mutations involved in cancer
- Proof of Concept study completed with Dana Farber Cancer Institute and presented at the American Association of Cancer Research and the American Society of Clinical Oncology meetings in 2011

La ricerca delle cellule tumorali circolanti (CTC) è stata eseguita usando il sistema di filtrazione ScreenCell[®] (ScreenCell, Sarcelles, Parigi, Francia) ed in particolare i kit ScreenCell Cyto ed MB. Per ogni campione di sangue prelevato sono stati allestiti due filtri.

Procedura di allestimento di un filtro: prima della filtrazione, al fine di lisare i globuli rossi, 3 ml di sangue vengono diluiti in 4 ml di una specifica soluzione tampone (ScreenCell FC) per 8 minuti a temperatura ambiente. I dispositivi di filtrazione ScreenCell comprendono un serbatoio per il filtraggio, un filtro ed un supporto rimovibile inferiore che permette l'inserimento, attraverso un canale cilindrico, di un provetta di raccolta. Il filtro con la membrana porosa, composto in policarbonato, è di 18 micron di spessore, con una superficie liscia e idrofila. I pori circolari sono calibrati appositamente ($7,5 \pm 0,36$ micron) e distribuiti casualmente nel filtro (1×10^5 pori / cm^2). Appena finita la filtrazione viene aggiunto e filtrato 1,6 ml di tampone fosfato salino (PBS) per rimuovere i residui di globuli rossi dal filtro. Per far completare la filtrazione si attendono circa 3 minuti (quando il tempo di filtrazione supera i 3 minuti il campione si considera micro-coagulato). Al termine della filtrazione il supporto rimovibile inferiore del dispositivo ScreenCell viene rimosso ed il filtro recuperato viene posizionato su carta assorbente

per 10 minuti. Il filtro ScreenCell viene quindi posizionato su uno vetrino per microscopia. Gli studi citologici compresi colorazione, enumerazione delle cellule e studi di immunocitochimica sono condotti direttamente sul filtro. Tutti i filtri sono delimitati da un anello di acciaio dotato di codice a barre per assicurare la tracciabilità dei campioni filtrati.





Per controllare la presenza di cellule adese al filtro, abbiamo eseguito una colorazione istochimica con GIEMSA, dopo l'osservazione al microscopio il filtro è stato conservato in frigo a -20°C, fino ai successivi esami immunocitochimici.

Per l'esame immunocitochimico, i filtri sono stati prima fissati in una soluzione di paraformaldeide al 4% per 5 minuti alla temperatura di 4°C e successivamente permeabilizzati con immersione in una soluzione di PBS +0,01% Tween 20 per 20 minuti a temperatura ambiente. Tutti i filtri sono stati quindi incubati con l'anticorpo monoclonale Pan-Citocheratina 8+18+19 (mouse anti-human codice 2A4, Abcam Cambridge, UK), alla diluizione ottimale di 1:100, per 1 ora a temperatura ambiente. I filtri sono stati quindi incubati con anticorpo secondario fluorescinato Alexa Fluor 488 goat anti- mouse IgG (H+L) (colorazione verde).

Successivamente, due filtri, dei quali uno preoperatorio ed uno postoperatorio, sono stati incubati con anticorpo monoclonale EpCAM (mouse anti-human clone C-10, codice sc-25308, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas U.S.A.), alla diluizione ottimale di 1:50 per 1 ora a temperatura ambiente; gli altri due filtri, dei quali uno preoperatorio ed uno postoperatorio, sono stati, invece, incubati con anticorpo monoclonale β -catenina (mouse anti-human, clone E-5, codice sc-7963, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas U.S.A.), alla diluizione ottimale di 1:50 per 1 ora, a temperatura ambiente. Tutti i filtri sono stati quindi incubati con anticorpo secondario fluoriscinato Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (H+L) (colorazione rossa). E' stata effettuata la controcolorazione dei nuclei con DAPI (colorazione blu). Tutti i filtri sono stati montati su vetrini portaoggetto e coperti con ulteriore vetrino coprioggetto tramite interposizione di montante acquoso (Faramount Aqueous Mounting Medium, Dako Glostrup, Denmark).

I segnali fluorescenti sono stati visualizzati in campo oscuro con microscopio Olympus IX50 dotato di idonei filtri per la fluorescenza.

Per ciascun filtro sono state contate esclusivamente le cellule positive per Pan-Citocheratina 8+18+19 (colorazione citoplasmatica verde) e successivamente valutate quante di queste cellule esprimevano contemporaneamente positività per EpCAM (prima coppia di filtri, uno pre ed uno postoperatorio: colorazione citoplasmatica verde relativa alla positività per citocheratina e colorazione citoplasmatica rossa relativa alla positività per EpCAM; Merge = colorazione gialla

da sovrapposizione della fluorescenza verde e rossa) e per β -catenina (seconda coppia di filtri, uno pre ed uno postoperatorio: colorazione citoplasmatica verde relativa alla positività per citocheratina e colorazione citoplasmatica rossa relativa alla positività per β -catenina; Merge = colorazione gialla da sovrapposizione della fluorescenza verde e rossa).

Il numero di cellule epiteliali circolanti (CK+) e di cellule epiteliali circolanti positive per EpCAM (CK+ e EpCAM+) e per catenina (CK+ e catenina+) è stato espresso come valore medio della conta di 5 campi del filtro scelti in maniera random all'ingrandimento 40X.

2.4. Studio Statistico

Lo studio statistico ha lo scopo di stabilire una correlazione tra la presenza delle CTCs nel pre- e postoperatorio e l'impatto della malattia sul paziente in termini di prognosi *quoad vitam* e *quoad valitudinem*. Pertanto, i valori ottenuti sono stati confrontati con recidiva/ metastasi/ decesso e terapia adiuvante/ chirurgia secondaria; quantificando il risultato grazie alle analisi statistiche che consentono di oggettivarlo.

In questo modo, si vuole dare un significato reale ai dati raccolti, riportando quello che è l'impatto effettivo e concreto della ricerca delle CTCs nel pre- e nel postoperatorio in campioni di sangue periferico di pazienti con diagnosi di carcinoma laringeo squamocellulare.

Dopo filtrazione cellulare, viene calcolata la media del numero di cellule positive in 5 campi 40X colorati mediante metodo GIEMSA.

Stabilendo un cut-off di una media di almeno 1 cellula in 5 campi a 40x si considerano positivi solo i pazienti che hanno almeno 1 cellula per tutti e tre i marcatori (PanCK= Pancitocheratina, B-Cat= beta-catenina, EpCAM= Epithelial cell adhesion molecule).

Le correlazioni tra i marcatori CTCs ed i parametri clinico-patologici sono stati esaminati e testati per correlazioni.

3. RISULTATI

3.1. Analisi Statistica

Caso	CTCs PRE	Intervento	Stadio istologico	CTCs POST 3 mesi	CTCs POST 6 mesi	CTCs POST 12 mesi
1 RM	+	Laringect Tot SLC bilat Emitiroidect	IV (pT4a pN0 G2 ulcerato infiltrante) R0	+	- (CH RT)	NA (deceduto)
2 DA	+	Laringect Subtot SLC bilat	III (pT3 pN0 G3 PN1 ulcerato) R0	+	NA (deceduto)	/
3 DF	+	Laringect Subtot SLC monolat	III (pT1b pN1 G1 infiltrante) R0	+	NA (deceduto)	/
4 CB	+	Laringect Subtot SLC bilat	III (pT3 pN0 G3 LN1 ulcerato) R0	+	+	-
5 DL	+	Laringect Subtot SLC bilat	III (pT2 pN1 G3 infiltrante) R0	+	- (CH)	NA (deceduto)
6 VA	-	Laringect Sovraglottica allargata SLC	IV (pT4a pN2b G3 LN1 infiltrante) R1	+	-	-
7 SA	+	Laringect Subtot SLC monolat	II (pT2 pN0 G2) R0	+	+	+
8 UA	-	Laringect Subtot SLC bilat	IV (pT4a pN0 G2 infiltrante) R0	+	-	-
9 RG	+	Rifiuta	<i>Uscito dallo studio</i>	NA	NA	NA

(+ = positività per tutti e tre i marcatori *PanCK*, *B-Cat*, *EpCam*; - = assenza di positività per tutti e tre i marcatori; CH RT = chemioterapia radioterapia; NA = non applicabile)

Casi	CTCs PREOP			Risultato Markers PRE	CTCs POSTOP 3 Mesi 6 Mesi 12 mesi			Risultato Markers POST	FOLLOW-UP POSTOP Breve termine Medio termine Lungo termine		
	PanCK	B-Cat	EpCAM		PanCK	B-Cat	EpCAM				
Operati Deceduti	DA (2)	19,4	2,5	9,25	+	31,15	15,6 NA NA	5,6 NA NA	6,25 NA NA	+ (=) 27,45 a 3 mesi (minima variazione risp al preop)	Disease-free Deceduto † NA
	DF (3)	3	2	2	+	7	7 NA NA	5,5 NA NA	1 NA NA	++ (>) 13,5 a 3 mesi (valore quasi raddoppiato)	Disease-free Deceduto † NA
Operati Chemioterattati Deceduti	RM (1)	3,3	1	2	+	6,3	8,2 0 NA	1,8 0 NA	4 0 NA	++ (>) 14 a 3 mesi (valore raddoppiato)	Disease-free Recidiva, M epat (ChERT) Deceduto †
	DL (5)	4	3	2	+	9	6 0 NA	4 0 NA	2 0 NA	+ (=) 12 a 3 mesi (minima variazione)	Disease-free Recidiva, M polmon (CH) Deceduto †
Operati (1 rioperato) Liberi da malattia	SA (7)	2,4	1	2	+	5,4	18,4 18,8 4,8	1 9,6 1,4	18 4,8 1,6	++ (>) 37,4 a 3 mesi e 33,2 a 6 mesi (più che raddoppiato ma 7,8 (<) a 12 mesi ovvero più che dimezzato dopo chirurgia secondaria)	Disease-free Recidiva (Laringect tot) Disease-free
	CB (4)	3	3	2	+	8	6,6 11 8,4	4,6 5,6 0,2	6 7,4 4,4	-	Disease-free
	VA (6)	3,8	3	0,8	-	-	7,9 0 2,8	4,4 0 0,8	8,3 0 0,8	-	Disease-free
	UA (8)	4,4	0,8	0,75	-	-	9,75 0 2,4	9 0 0,8	4,4 0 1,4	-	Disease-free

Media n° cellule positive (+) in 5 campi 40X.

In rosso i **negativi**: stabilendo un cut-off di una media di almeno 1 cellula in 5 campi a 40x si considerano **positivi** solo i pazienti che hanno almeno 1 cellula per tutti e tre i marcatori.

In verde i pazienti ritenuti **falsi negativi** perchè in chemioterapia al momento del prelievo.

In neretto i pazienti considerati **veri positivi**, ovvero risultati positivi per tutti e tre i marcatori, che hanno avuto un aggravamento della prognosi.

In corsivo le somme dei valori)

I pazienti reclutati per lo studio erano in totale 9, tutti di sesso maschile. L'età media era di 62 anni (range 56-86). Nessuno dei pazienti riferiva in anamnesi precedenti tumori né trattamenti per tumori. Tutti i pazienti fumavano da più di 10 anni un numero di sigarette compreso tra 10 e 40 al giorno. Nessun paziente risultava alcolista. Tutti i pazienti avevano un performance status secondo la classificazione di Karnofsky compreso tra 80% e 100%.

Dati PRE-operatori – Tutti e 9 i pazienti eseguivano il prelievo ematico preoperatorio per lo studio delle CTCs ma soltanto 8 si sottoponevano all'intervento chirurgico, poiché un paziente decideva successivamente di rifiutare l'intervento chirurgico, uscendo conseguentemente dallo studio (Caso 9.RG).

Un paziente è stato sottoposto a laringectomia totale ed emitiroidectomia, 6 pazienti sono stati sottoposti a laringectomia subtotale sovracricoidea con cricoioidoepiglottopessia secondo Labayle, un paziente è stato sottoposto a laringectomia sovraglottica allargata al base lingua. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a svuotamento laterocervicale mono o bilaterale in base allo stadio e della localizzazione di malattia.

I tumori sono stati stadiati in base ai risultati degli esami istologici postoperatori secondo la classificazione TNM dell'AJCC / UICC. Quattro pazienti avevano uno stadio istologico III, tre pazienti uno stadio istologico IV, un paziente avevano uno stadio istologico II.

Sono state individuate CTC positive per pancitocheratine nei campioni preoperatori del 100% dei pazienti analizzati (8/8). Stabilendo un cut-off di una media di almeno una cellula in 5 campi a 40x sono risultati positivi per la presenza di cellule EpCam 6 campioni preoperatori su 8 (6/8 = 75%). Usando lo stesso cut-off sono risultati positivi per la β -catenina 7 campioni preoperatori su 8 (7/8 = 87,5%).

Pertanto, nella fase preoperatoria, si ritengono positivi per la presenza di CTCs nel sangue periferico 6 pazienti su 8 con carcinoma laringeo stadio clinico III.

<i>Dati PRE</i>	N° Pz
Tot Pz esaminati	8
PanCK +	8
B-Cat +	7
EpCam +	6
Riammalati nel postop	5
Deceduti nel postop	4

Risultati dei campioni ematici preoperatori:
 6 pazienti su 8 sono risultati positivi per tutti e tre i marcatori. Di questi 6, vedremo che 5 pazienti hanno avuto un peggioramento clinico nel periodo postoperatorio

Dati POST-operatori – Tutti gli 8 pazienti che avevano eseguito il prelievo ematico nei 3 mesi postoperatori, erano risultati positivi alla ricerca delle CTCs e risultavano clinicamente liberi da malattia al follow-up a breve termine.

<i>Dati POST 3 mesi</i>	N° Pz
Tot Pz esaminati	8
PanCK +	8
B-Cat +	8
EpCam +	8

Risultati dei campioni ematici al controllo postoperatorio a breve termine:
 8 pazienti su 8 sono risultati positivi per tutti e tre i marcatori. Dopo la chirurgia è possibile marcare CTCs nel 100% dei pazienti

Pochi mesi dopo, si registravano 2 decessi (Casi 2.DA e 3.DS) e 3 recidive di cui 2 casi con metastasi (1.RM e 5.DL).

Il caso con recidiva in assenza di metastasi (7.SA) veniva sottoposto a ulteriore chirurgia (laringectomia totale).

Il caso con recidiva e metastasi epatiche (1.RM) veniva sottoposto a chemio- e radioterapia.

Il caso con recidiva e metastasi polmonari (5.DL) veniva sottoposto a chemioterapia.

6 pazienti eseguivano il prelievo ematico per la ricerca delle CTCs al controllo postoperatorio a 6 mesi. Di questi, risultavano negativi per la ricerca delle CTCs, i 2 pazienti che stavano eseguendo chemioterapia (verosimilmente falsi negativi) e 2 pazienti clinicamente liberi da malattia (6.VA e 8.UA).

Risultavano invece positivi alla ricerca di CTCs nel sangue periferico, il paziente con recidiva sottoposto a chirurgia secondaria di laringectomia totale (7.SA) e un paziente clinicamente libero da malattia (4.CB).

<i>Dati POST 6 mesi</i>	N° Pz	PanCK, B-Cat, EpCam (+/- a tutti e 3 i marcatori)
Campione iniziale	8	
Deceduti	2	+ nel preop e nel postop 3 mesi
Tot Pz esaminati a 6 mesi	6	
Pz Rioperato per recidive	1	+
Pz CH-trattati per recidiva e metastasi	2	- (falsi negativi per CH)
Pz Disease-free	3	1 + 2 -

Risultati dei campioni ematici al controllo postoperatorio a medio termine:
2 pz deceduti; 2 pz negativi ai markers verosimilmente perché in atto chemioterapia; 2 pz negativi liberi da malattia; 2 pz positivi di cui uno rioperato per recidiva e uno libero da malattia

Poco prima del follow-up a 12 mesi, si registravano il decesso dei 2 pazienti sottoposti a terapia adiuvante. Pertanto, è stato possibile prelevare un campione ematico al controllo postoperatorio ad 1 anno a 4 pazienti. Di questi, 3 pazienti risultavano negativi e 1 positivo. Tutti e quattro questi pazienti erano clinicamente liberi da malattia.

Dati POST 12 mesi	N° Pz	PanCK, B-Cat, EpCam (+/- a tutti e 3 i marcatori)
Campione iniziale	8	
Deceduti	4	+ nel preop e nel postop 3 mesi
Tot Pz esaminati a 6 mesi	4	
Pz Disease-free	4	1 + (con valori in <) 3 -

Risultati dei campioni ematici al controllo postoperatorio a lungo termine:
4 pazienti deceduti; 4 pazienti liberi da malattia di cui 3 negativi ai markers e uno positivo
ma con valori in forte riduzione dopo chirurgia secondaria

Markers – Come detto nella sezione materiali e metodi, sono stati considerati positivi solo i casi in cui si poteva evidenziare almeno 1 cellula in 5 campi a 40x per tutti e tre i marcatori (PanCK= Pancitocheratina, B-Cat= beta-catenina, EpCAM= Epithelial cell adhesion molecule). Mettendo a confronto i valori ottenuti dai singoli marcatori si possono osservare dati interessanti.

La media di cellule trovate positive per i rispettivi marcatori, calcolata sulla totalità degli otto pazienti è stata di 20,125 per le PanCK; 7,875 per le B-Cat; 10,625 per le EpCAM.

La presenza di cellule EpCAM positive è risultata sempre associata alla presenza di PanCK positive nei campioni preoperatori e postoperatori.

Per le PanCK è stato osservato un aumento del numero di cellule positive tra il preoperatorio e il postoperatorio a breve termine (3 mesi) per 7 pazienti su 8 (87,5%). Un ulteriore incremento per 2 pz su 6 nel postoperatorio a 6 mesi (33,3%), per poi seguire un decremento nel postoperatorio a 12 mesi per 2 pazienti su 4 (50%) e un lievissimo aumento per i restanti 2 (50%).

Per le cellule β -catenina positive si è riscontrato un incremento tra il pre- e il postoperatorio a 3 mesi per 6 su 8 pazienti (75%). Un ulteriore incremento al controllo postoperatorio a 6 mesi per 2 pazienti su 6 (33,3). Al postoperatorio a 12 mesi soltanto un paziente era positivo peraltro con decremento (25%).

Pz	PanCK				B-Cat				EpCAM			
	PRE	POST 3 M	POST 6 M	POST 12 M	PRE	POST 3 M	POST 6 M	POST 12 M	PRE	POST 3 M	POST 6 M	POST 12 M
1. RM	3	8	0 (CH)	♀	1	1	0 (CH)	♀	2	4	0 (CH)	♀
2. DA	19	15	♀		2	5	♀		9	6	♀	
3. DF	3	7	♀		2	5	♀		2	1	♀	
4. CB	3	6	11	8	3	4	5	0	2	6	7	4
5. DL	4	6	0 (CH)	♀	3	4	0 (CH)	♀	2	2	0 (CH)	♀
6. VA	3	7	0	2	3	4	0	0	0	8	0	0
7. SA	2	18	18 (Riop)	4	1	1	9 (Riop)	1	2	18	4 (Riop)	1
8. UA	4	9	0	2	0	9	0	0	0	4	0	1

Cut-off almeno 1 cellula positiva per marcatore in 5 campi a 40X

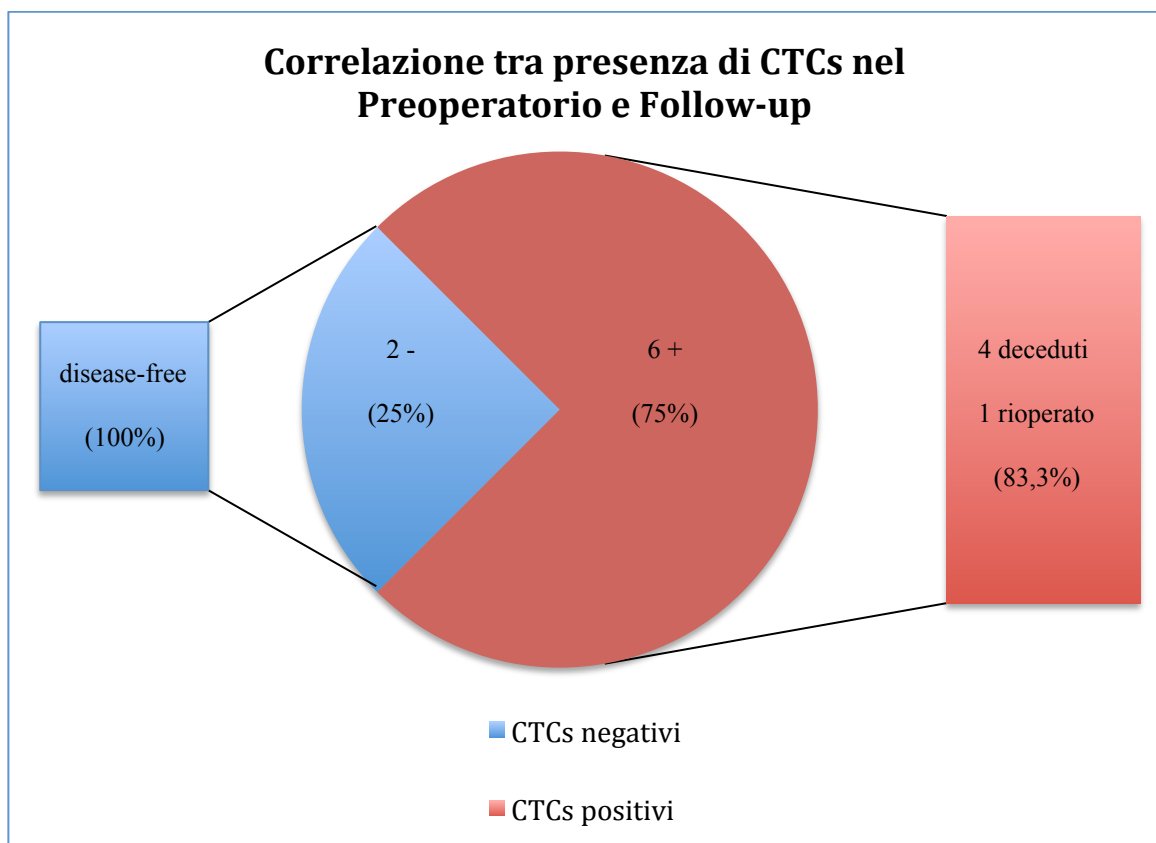
Pz	PanCK TOT (pre+post)	B-Cat TOT (pre+post)	EpCAM TOT (pre+post)
1	11	2	6
2	34	7	15
3	9	7	3
4	28	12	19
5	10	7	4
6	12	7	8
7	42	12	25
8	15	9	5
TOT	161	63	85
Media	20,125	7,875	10,625

Infine, Per le cellule EpCAM positive si è registrato un incremento per 5 pazienti su 8 tra il pre- e il postoperatorio a 3 mesi (62,5%). Un ulteriore incremento a 6 mesi soltanto per un paziente su sei (10,6%). A 12 mesi soltanto un caso di lievissimo incremento (25%).

3.1.1. Interpretazione dei Dati Preoperatori

Dall'esame dei dati **preoperatori**, si può dedurre che una positività alle CTCs prima dell'intervento chirurgico può associarsi ad una peggiore prognosi, mentre una negatività nel preoperatorio si associa ad una prognosi favorevole.

Infatti di 6 pazienti risultati positivi per la ricerca di CTCs su otto esaminati nel preoperatorio, 5 pazienti (83,3%) hanno avuto un peggioramento nel postoperatorio (4 morti, 1 rioperato); 2 pazienti risultati negativi nel preoperatorio sono rimasti disease-free a tutti i follow-up (100%).



3.1.2. Interpretazione dei Dati Postoperatori a Breve termine

Dall'osservazione dei dati **postoperatori a breve termine** (3 mesi) é possibile dedurre che subito dopo la chirurgia si possono trovare CTCs in tutti i pazienti. Questo dato non ha un immediato riscontro nella clinica a breve termine ma lo avrà nel medio e nel lungo termine.

E' interessante notare che la loro diminuzione (verosimilmente per apoptosi) ai controlli a medio e lungo termine (6 e 12 mesi) rispetto ai valori registrati a breve termine (3 mesi), si può associare a un miglioramento della prognosi.

Infatti, 8 pazienti su 8 esaminati (100%) risultavano positivi a 3 mesi, in assenza di segni di ricaduta immediata di malattia.

5 pazienti su 8 (62,5%) che hanno avuto valori aumentati o sovrapponibili al pre hanno avuto un peggioramento della prognosi. 4 di questi sono deceduti (Casi 1,2,3,5) e un paziente (Caso 7) ha mostrato a 3 mesi e 6 mesi un aumento della positività che ha corrisposto a una ricaduta di malattia e chirurgia secondaria e successivamente a 12 mesi più che un dimezzamento dei valori che ha corrisposto al miglioramento della prognosi.

I pazienti che hanno avuto riduzione o azzeramento al controllo a lungo termine (12 mesi) hanno avuto una prognosi positiva (Casi 4,6,8).

3.1.3. Interpretazione dei Dati Postoperatori a Medio termine

Dall'esame dei dati **postoperatori a medio termine** (6 mesi) si può dedurre che:

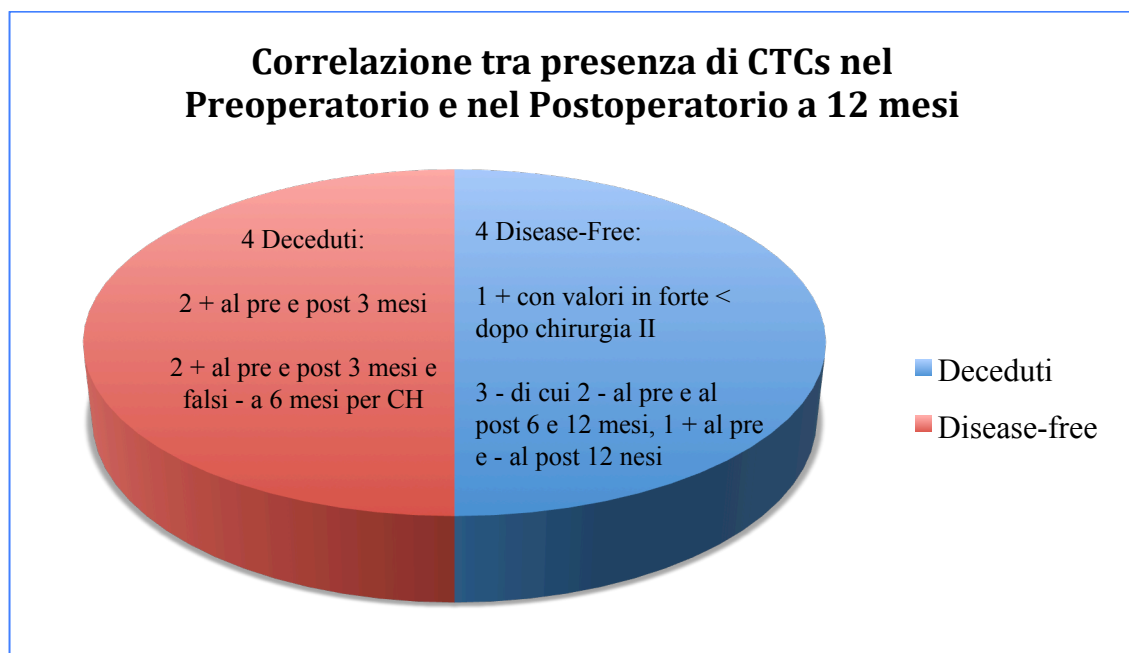
- La corrispondenza di negatività alla ricerca di CTCs sia nel pre- che nel postoperatorio a 6 mesi è un fattore prognostico positivo (2 pazienti su 8 erano negativi sia nel pre- che nel postoperatorio a 6 mesi e sono sempre stati liberi da malattia a tutti i follow-up).
- La chemioterapia crea falsi negativi per la presenza di antitumorali nel sangue e inevitabilmente nel campione ematico oggetto di studio.
- I pazienti che risultano positivi sia nel pre- che nel postoperatorio a 6 mesi devono essere controllati a più stretto follow-up perché 1 su 2 (50%) ha mostrato una predisposizione al peggioramento (ricidiva e necessità di reintervento).



3.1.4. Interpretazione dei Dati Postoperatori a Lungo termine

Dall'esame dei dati **postoperatori a 12 mesi**, si osserva che:

- La negatività alle CTCs sia al pre- che al postoperatorio a medio e lungo termine (6 e 12 mesi) si associa a prognosi favorevole.
- La positività alla CTCs sia nel pre- che nel postoperatorio si associa a prognosi infausta se non c'è diminuzione dei valori nel lungo termine. Infatti, i pazienti positivi alle CTCs sia nel pre- che nel postoperatorio tutti deceduti, tranne il pz rioperato che ha mostrato una forte diminuzione della positività ai markers nel postoperatorio a lungo termine).

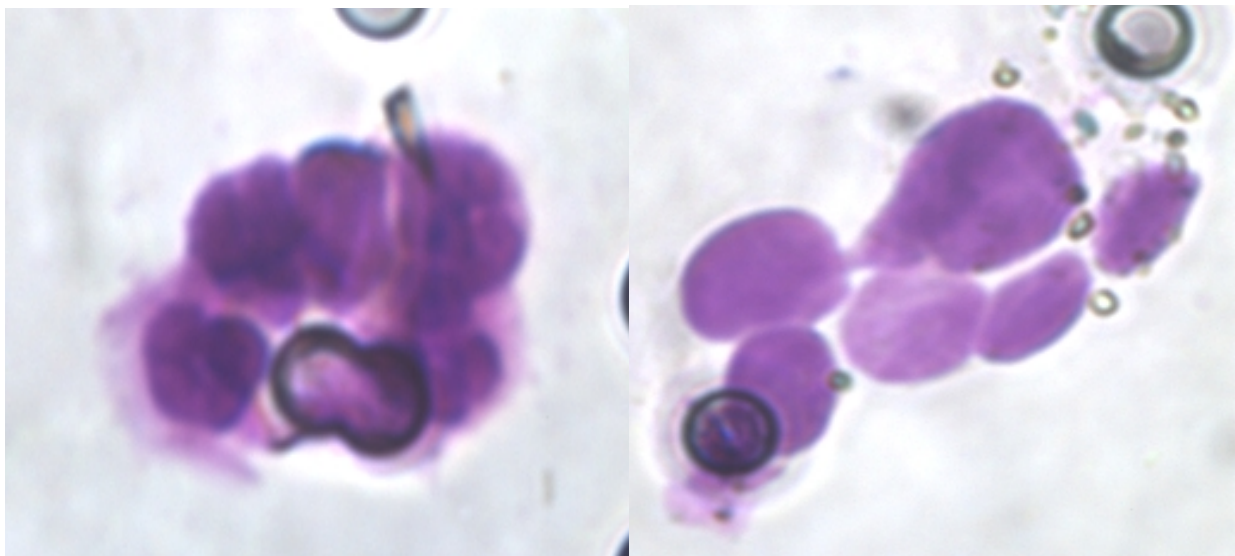


3.2. Microscopia

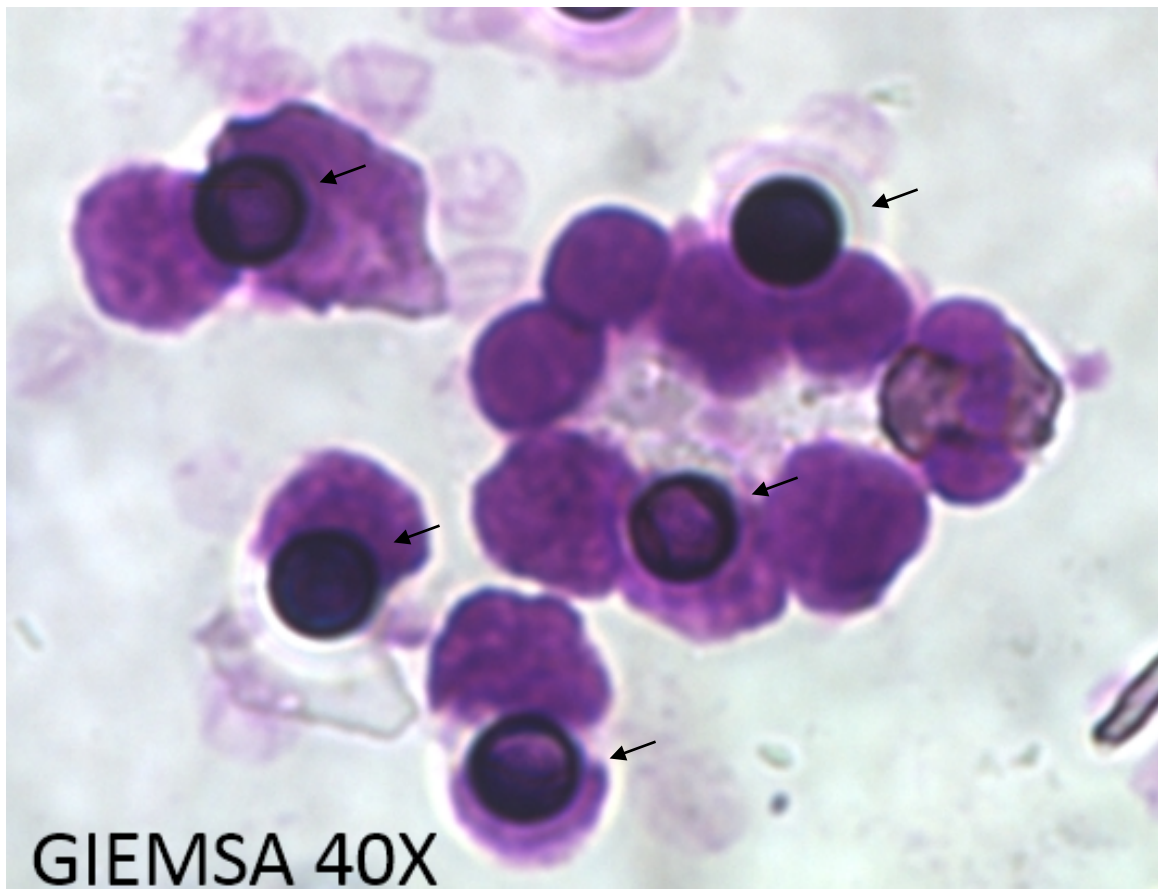
La colorazione utilizzata per lo studio immunocitologico delle CTCs era la May-Grunwald-GIEMSA.

I substrati su cui le cellule erano isolate erano esaminati direttamente al microscopio con ingrandimento 40X. I micropori si potevano osservare come fori tondi distribuiti irregolarmente di dimensioni uniformi. Nei campi d'analisi, le CTCs apparivano con distribuzione casuale, raggruppate o distanziate l'una dalle altre. [Fig. 1]

I criteri di malignità presi in considerazione sono stati simili ai criteri di malignità tradizionalmente utilizzati per gli esami citologici. La dimensione nucleare era significativa; il rapporto nucleocitoplasmatico era alto; il nucleo era denso e ipercromatico. la membrana nucleare era irregolare.



40X con colorazione GIEMSA delle CTCs sul filtro ScreenCell. Le frecce indicano i pori del filtro.



Inoltre, le CTCs sono state valutate al microscopio a fluorescenza. Tale microscopio ottico ha consentito di studiare i campioni sfruttando i fenomeni della fluorescenza e della fosforescenza indotti nel campione.

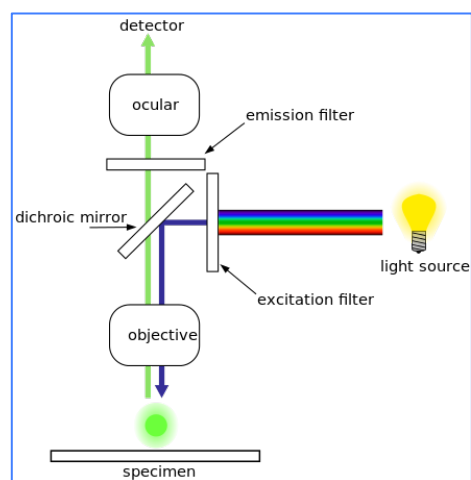
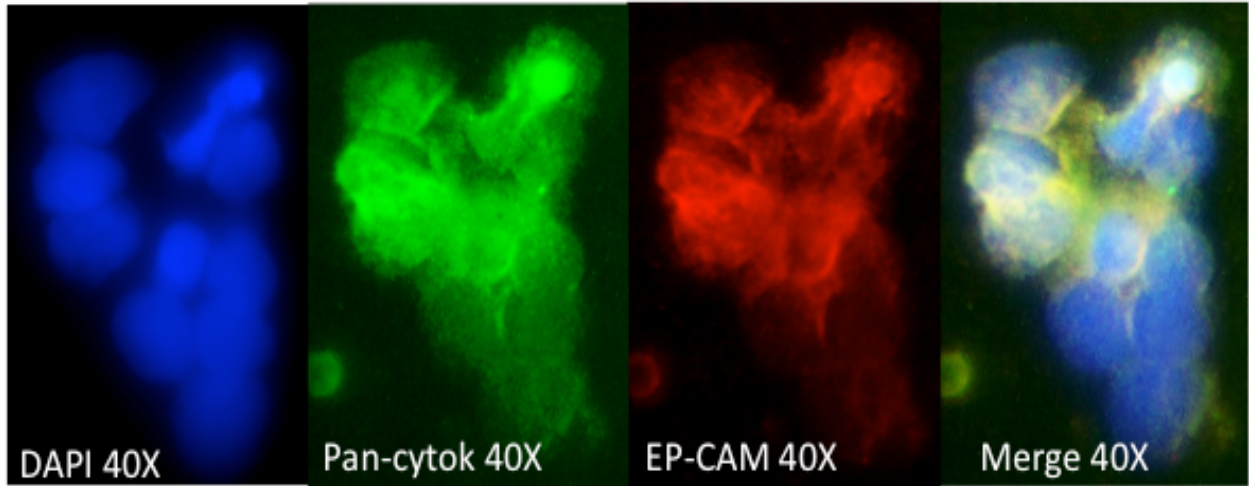


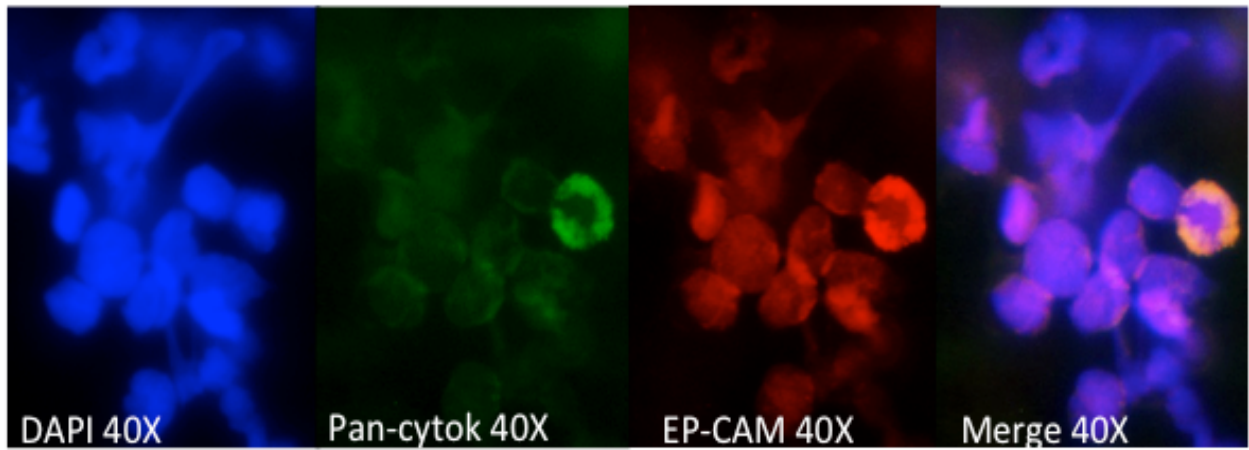
Immagine schematica di un microscopio a fluorescenza

Campioni pre- e post-operatori al microscopio a fluorescenza

PRE-OPERATORIO

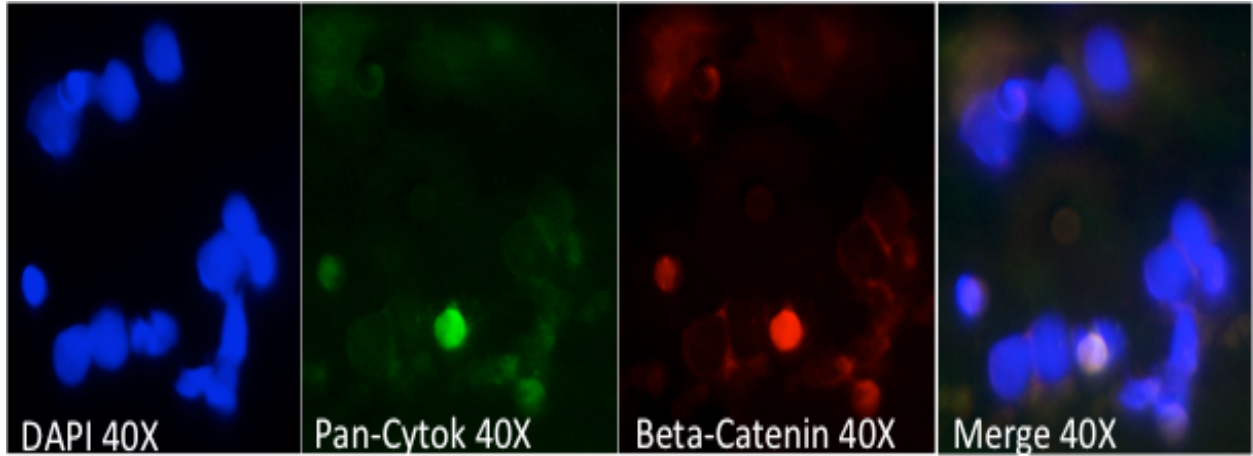


POST-OPERATORIO

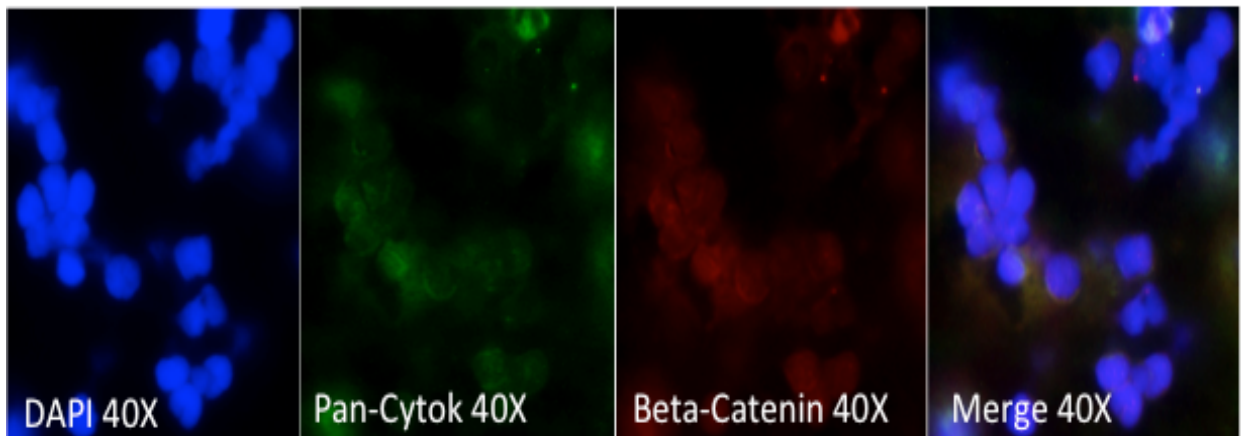


Campioni pre- e post-operatori al microscopio a fluorescenza

PRE-OPERATORIO



POST-OPERATORIO



4. DISCUSSIONE

L'incidenza del carcinoma laringeo aumenta di anno in anno [13, 14]. Si registrano 156.877 nuovi casi/aa e 83.376 morti/aa nel mondo (*WHO, International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012*). In Italia negli ultimi 90 anni, il numero di casi/anno è aumentato di 9 volte e l'incidenza risulta pari a 7000 nuovi casi l'anno. Grazie alla chirurgia laringea e alla chemio-radioterapia, i pz hanno un tasso di sopravvivenza superiore a 5 aa, ma il 30-40% muore ancora di recidiva o metastasi [10-15] nonostante l'approccio terapeutico combinato di chirurgia laringea e chemio-radioterapia.

La stadiazione TNM è il sistema unico utilizzato per la prognosi del carcinoma della laringe. Essa crea classi di rischio con diversa prognosi, ma con elevata variabilità del rischio all'interno di ogni classe. Non rappresenta, pertanto, uno strumento prognostico ottimale per il singolo paziente.

Per le ragioni su esposte, risulta urgente la necessità di progettare nuovi fattori prognostici al fine di migliorare le terapie e, conseguentemente, la prognosi *quoad vitam* e *quoad valitudinem* dei pazienti affetti da carcinoma laringeo.

Studi emergenti indagano circa la presenza di Cellule Tumorali Circolanti (CTCs) nei tumori solidi. Diversi ricercatori ritengono che le informazioni ottenute dalle CTCs potrebbero svolgere un ruolo di "biopsia liquida" nella valutazione clinica dei pazienti affetti da cancro. [25] In effetti, la ricerca delle CTCs è stata validata come fattore prognostico nei carcinoma metastatici della mammella, del colon-retto e della prostata. [26-29]

Molti gruppi di ricerca nel mondo sono impegnati nella ricerca e nella caratterizzazione

di queste cellule anche in tutti gli altri tumori solidi, tra cui le neoplasie maligne del distretto testa-collo. [30-33]

Il presente studio, è il primo che rileva le CTCs nel sangue dei pazienti con carcinoma della laringe utilizzando la tecnologia ScreenCell[®] e proponendo una comparazione di campioni preoperatori e postoperatori.

Le tecniche per la rilevazione delle CTCs sono divisi essenzialmente in due categorie, immunologica e morfologica.

Il sistema Cell-Search[®] è il metodo immunologico più utilizzato per la determinazione delle CTCs nelle neoplasie maligne della testa e del collo. [34-41] Esso comporta la separazione delle CTCs dalle cellule del sangue sulla base del loro fenotipo. Poiché i più comuni tumori solidi sono di origine epiteliale, il principio di questa tecnica si basa sul fatto che le CTCs può esprimere marcatori epiteliali. [42-44] I limiti di questa tecnologia sono importanti. Infatti, durante la progressione del tumore, le cellule neoplastiche possono perdere i loro antigeni di differenziazione, particolarmente gli antigeni epiteliali, e acquisire antigeni di transizione epitelio-mesenchimale (EMT). [45, 46] Questo fenomeno è uno dei principali ostacoli ai metodi di selezione delle CTCs basati sull'espressione del fenotipo. Molti falsi negativi si devono alla presenza di CTCs in EMT che non esprimono più marcatori di differenziazione epiteliale.

La tecnologia ScreenCell[®] è, invece, basata sulle caratteristiche morfologiche delle CTCs. Le CTCs sono più grandi rispetto alla maggior parte delle cellule normalmente presenti nel sangue, pertanto è possibile trattenerle su un substrato perforato con micropori che lasci passare le cellule del sangue. L'analisi citologica delle CTCs, selezionate in base alle dimensioni, permette la loro identificazione sulla base dei criteri di malignità classici. Questo può essere fatto per ricercare le CTCs in qualsiasi tumore solido, epiteliale o non-epiteliale, perché la selezione non si basa sul fenotipo del tumore. Pertanto questa metodologia consente anche la rilevazione di

cellule in EMT. [47]

Lo studio prospettico è stato disegnato in modo che potessimo analizzare:

- un campione di 10 ml di sangue nella fase preoperatoria del paziente in attesa di asportazione del carcinoma laringeo di tipo squamocellulare;
- un campione di 10 ml di sangue nel postoperatorio a breve, a medio e a lungo termine.

Il gruppo di pazienti in esame era omogeneo e presentava uno stadio clinico III. Le CTCs sono state identificate da prove dirette di immunocistochemica e sono state studiate per la caratterizzazione citologica e molecolare utilizzando ScreenCell[®] cyto kit e ScreenCell[®] MB kit.

Il metodo ScreenCell preserva la morfologia cellulare. Partendo da un semplice prelievo di sangue venoso, gli eritrociti vengono lisati e le altre cellule sono fissate da un buffer aggiunto al sangue. La miscela viene aspirata attraverso una membrana perforata, i cui pori sono più piccoli delle CTCs (8 micron). Dopo filtrazione, le cellule non ematiche vengono trattenute e la membrana che le contiene può essere analizzata direttamente, utilizzando un microscopio.

Com'è documentato nella sezione dei risultati, la presenza di CTCs nel preoperatorio e nel postoperatorio ha un impatto considerevole sulla prognosi dei pazienti affetti da carcinoma laringeo squamocellulare. L'assenza di CTCs correla con una prognosi favorevole ed un postoperatorio disease-free; la presenza di un elevato numero di CTCs nel sangue periferico correla con una prognosi sfavorevole, mentre una riduzione del numero di CTCs è correlata ad un intervallo libero da malattia più lungo e ad una risposta terapeutica migliore. La precoce rilevazione delle CTCs può anticipare di qualche mese la presenza di una recidiva o di una metastasi a distanza.

Si deduce facilmente che le CTCs possono rappresentare fattori prognostici indipendenti, implementando la valutazione clinica di routine. La loro identificazione e la loro caratterizzazione possono migliorare la stratificazione del rischio ed essere utili nella selezione

dei pazienti da trattare con terapia neoadiuvante e adiuvante con un timing differente da quello attuale.

Si tratta di cellule rare in termini di numero, assenti nei pazienti in buona salute o affetti da patologie non neoplastiche. Sono le cellule tumorali derivate dal tumore primario che causano recidiva e metastasi. Esse sono presenti nel sangue, dove si mescolano con altri componenti del sangue. Durante la fase invasiva del cancro, cellule tumorali in EMT possono passare attraverso le pareti dei vasi sanguigni e circolare insieme ai globuli rossi e bianchi. [48] Si stima che 1 grammo di cancro può rilasciare milioni di cellule tumorali al giorno nel sangue periferico. Quindi, una percentuale significativa di CTCs sono apoptotiche. Il che vuol dire che i tumori possono avere diverse sottopopolazioni di cellule con diversa capacità metastatica.

Le CTCs sono state osservate per la prima volta nel 1869 nel sangue di un uomo con il cancro metastatico da Thomas Ashworth, che ipotizzò che "la presenza nel sangue di cellule identiche a quelle del cancro stesso può spiegare la modalità di origine di tumori multipli in una stessa persona". Un'analisi approfondita della morfologia delle cellule portò Ashworth a concludere che "una cosa è certa, che se le cellule provengono dalla struttura tumorale, devono aver attraversato la maggior parte del sistema circolatorio per essere arrivate alla vena safena interna nella gamba sana". [49] L'importanza delle CTCs nella ricerca sul cancro è ritornata in auge nella metà degli anni 90 con la dimostrazione da parte di Uhr, Terstappen, Liberti *et al.* dell'esistenza di CTCs. [50-52] Questo risultato è stato ottenuto grazie alle nuove tecnologie di separazione magnetica che impiegano ferrofluidi (nanoparticelle magnetiche colloidali) e separatori magnetici ad elevato gradiente inventati da Liberti presso al *Immunicon* (oggi *Janssen Diagnostics* del gruppo Johnson & Johnson proprietaria del sistema CellSearch) e sono stati supportati da calcoli teorici di Liberti e Terstappen che supponevano che lo spargimento di meno dell'1,0% di cellule al giorno da parte di tumori molto piccoli poteva produrre un quantitativo sufficiente di cellule rilevabili nel sangue. Da allora sono state utilizzate numerose tecnologie per

l'enumerazione e l'identificazione delle CTCs. [53, 54] La ricerca ha dimostrato che le CTCs derivano da cloni del tumore primitivo, convalidando le osservazioni di Ashworth. [55] Lo studio delle proprietà biologiche delle CTCs ha dimostrato il ruolo fondamentale che queste cellule tumorali circolanti giocano nella diffusione metastatica dei carcinomi. [56] Inoltre l'analisi unicellulare ha dimostrato un elevato livello di eterogeneità a livello della singola cellula sia nell'espressione di proteine sia nella localizzazione delle proteine a livello citoplasmatico e le CTCs hanno dimostrato di avere sia le caratteristiche delle cellule provenienti dalla biopsia del tumore primitivo sia le modificazioni osservate nelle lesioni metastatiche. Le CTCs potrebbero vengono per queste ragioni considerate come una "biopsia liquida" [57] Peraltro, i prelievi ematici rappresentano una metodica semplice, veloce, sicura e ripetibile più volte nel corso del tempo con la compliance del paziente.

5. CONCLUSIONI

In conclusione, la rilevazione della presenza delle CTCs nel sangue periferico di pazienti affetti da carcinoma laringeo, potrebbe consentire una gestione del paziente più mirata ed efficace.

Il presente studio è il primo che rileva le CTCs nel sangue dei pazienti con carcinoma della laringe utilizzando la tecnologia ScreenCell® proponendo una comparazione di campioni preoperatori e postoperatori.

I risultati della ricerca dimostrano che l'identificazione di CTCs nel preoperatorio e nel postoperatorio ha un impatto considerevole sulla prognosi dei pazienti affetti da carcinoma laringeo di tipo squamocellulare.

Lo studio dimostra, infatti, una correlazione significativa tra l'assenza/ presenza di CTCs positive contemporaneamente per PanCK, B-Cat, EpCAM e prognosi positiva/ negativa, rispettivamente, soprattutto nel rilevamento preoperatorio rispetto ai follow-up a medio e lungo termine:

- Il 100% dei pazienti risultati negativi per la ricerca delle CTCs nel controllo preoperatorio sono rimasti liberi da malattia in tutti i follow-up;
- L'83% dei pazienti risultati positivi per la ricerca di CTCs nel controllo preoperatorio hanno avuto un peggioramento documentato nei controlli postoperatori (4 morti, 1 rioperato).

Tutti i pazienti indagati avevano il medesimo stadio clinico calcolato in base al sistema TNM, ovvero uno stadio clinico III, e tutti sono stati sottoposti a chirurgia radicale dallo stesso chirurgo operatore.

Si deduce facilmente che le CTCs possono rappresentare fattori prognostici indipendenti, implementando la valutazione clinica di routine. La loro identificazione e la loro caratterizzazione possono migliorare la stratificazione del rischio ed essere utili nella selezione dei pazienti da trattare con terapia neoadiuvante e adiuvante con un timing differente da quello attuale.

L'identificazione di CTCs nel periodo antecedente all'asportazione chirurgica del tumore, può individuare precocemente i pazienti a maggior rischio di recidiva o metastasi dopo chirurgia radicale, pertanto potrebbe essere un criterio per la scelta dei pazienti da sottoporre a terapia neoadiuvante, in aggiunta ai criteri clinici e patologici già in uso.

Allo stesso modo, l'identificazione di CTCs nel periodo successivo alla chirurgia (nella nostra esperienza nel follow-up a 6 mesi) potrebbe essere un criterio per la scelta dei pazienti da sottoporre a terapia adiuvante, sempre in aggiunta ai criteri clinici e patologici già in uso.

La precoce rilevazione delle CTCs, sia nel pre- che nel postoperatorio, può anticipare di qualche mese la presenza di una recidiva o di una metastasi a distanza.

Anche nella malattia metastatica la ricerca delle CTCs potrebbe avere un possibile impiego, ovverosia quello di monitorare l'andamento della neoplasia durante terapia medica, in associazione ai criteri radiologici, in quanto la riduzione del numero di CTCs appare essere correlata ad una risposta terapeutica migliore.

Lo studio delle CTCs può, inoltre, ampliare la comprensione della biologia del cancro e migliorare le strategie terapeutiche. In futuro, crediamo, infatti, che la combinazione delle attuali terapie (chirurgia, chemioterapia, radioterapia) con terapia mirata per eliminare le CTCs potrà avere un impatto significativamente positivo sull'outcome a lungo termine dei pazienti con carcinoma della laringe. [58] Ad oggi l'impegno delle metodiche di identificazione delle CTCs nella pratica clinica, per quanto affascinante, risulta molto limitato. Sono pertanto necessari

ulteriori studi e avanzi scientifici per poter sperare, in prospettiva, di poter implementare l'analisi delle CTCs nello scenario clinico di routine.

Bibliografia

- [1] Lefebvre JL C-DB, Degardin M, Kara A, Mallet Y, Ton Van J. Treatment of laryngeal cancer: the permanent challenge. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2004;9:13-920.
- [2] Behbod F, Rosen JM. Will cancer stem cells provide new therapeutic targets? *Carcinogenesis*. 2005; 26(4):703–711.
- [3] Zhang Z, Filho MS, Nör JE. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol*. 2012; 48(1):1-9.
- [4] Wechsler J. Cellules Tumorales Circulantes des Cancers Solides. Atlas de cytologie. Group Horizon. France 2015 pp. 16-7
- [5] Gröbe A et al. Prognostic relevance of circulating tumor cells in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Clin Cancer Res*. 2014 Jan 15;20(2):425-33.
- [6] Hardingham JE et al. Rilevamento e significato clinico di cellule tumorali circolanti nel cancro colorettale. 20 anni di progressi. *Mol Med*. 2015 Oct 27;21(Suppl 1): S25-S31.
- [7] Racila E, Euhus D, Weiss AJ et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:4589-4594.
- [8] Marrinucci D, Bethel K, Kolatkar A et al. Fluid biopsy in patients with metastatic prostate, pancreatic and breast cancers. *Phys Biol* 2012; 9:016003.
- [9] Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* 2014; 158:1110-1122.
- [10] Suer I, Karatas OF, Yuceturk B, Yilmaz M, Guven G, Buge O, Cansiz H, Ozen M. Characterization of Stem-Like Cells Directly Isolated From Freshly Resected Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Specimens. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2014 Mar [Epub ahead of print].
- [11] Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010; 60(5):277-300.
- [12] Weir HK et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Sep 3;95(17):1276-99. Review. Erratum in: *J Natl Cancer Inst*. 2003 Nov 5;95(21):1641.
- [13] Yu D, Jin C, Liu Y, Yang J, Zhao Y, Wang H, Zhao X, Cheng J, Liu X, Liu C. Clinical implications of cancer stem cell-like side population cells in human laryngeal cancer. *Tumour Biol*. 2013; 34(6): 3603–3610.
- [14] Hoffman HT PK, Karnell LH. Laryngeal cancer in the United States: changes in demographics, patterns of care, and survival. *Laryngoscope*, 2006:1-13.

- [15] Hall FT OBC, Clifford AR, McNeil EB, Bron L, Jackson MA. Clinical outcome following total laryngectomy for cancer. *Aust N Z J Surg*, 2003:300-305.
- [16] Albera R. RG. *Otorinolaringoiatria*. Torino: Edizioni Minerva Medica, 2008.
- [17] Assimakopoulos D PG, Lascaratos J. Highlights in the evolution of diagnosis and treatment of laryngeal cancer. *Laryngoscope*, 2003:557–562.)
- [18] Hinerman RW MC, Amdur RJ. Surgery and postoperative radiotherapy for squamous cell carcinoma of the larynx and pharynx. *Am J Clin Oncol*, 2006:613–621.
- [19] Marioni G M-RR, Cartei G, Marchese F, Staffieri A. Current opinion in diagnosis and treatment of laryngeal carcinoma. *Cancer Treat Rev*, 2006:504–515.
- [20] Pfister DG LS, Weinstein GS. American Society of Clinical Oncology clinical practices guideline for the use of larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer. *J Clin Oncol*, 2006:3693–3704.
- [21] Lefebvre JL CG. Larynx preservation, state of the art. *Cancer Radiother*, 2005:37-41.
- [22] Hans S BD, Chevalier D. Organ preservation surgery in pharyngolaryngeal cancer *Rev Prat*, 2006:1667–1674.
- [23] Motamed M LO, Bradley PJ. Salvage conservation laryngeal surgery after irradiation failure for early laryngeal cancer. *Laryngoscope*, 2006:451–455.
- [24] Holsinger FC FE, Roberts DB, Diaz EM Jr. Conservation laryngeal surgery versus total laryngectomy for radiation failure in laryngeal cancer. *Head Neck*, 2006:779–784.
- [25] Alix-Panabieres C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem*. 59, 110–118 (2013).
- [26] Heitzer E., Auer M., Ulz P., Geigl J. B. & Speicher M. R. Circulating tumor cells and DNA as liquid biopsies. *Genome Med*. 5, 73 (2013).
- [27] Cohen S. J. et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 26, 3213–3221 (2008).
- [28] Cristofanilli M. et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 1420–1430 (2005).
- [29] Winter SC, Stephenson SA, Subramaniam SK et al. Long term survival following the detection of circulating tumour cells in head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2009; 9:424.
- [30] Wu XL, Tu Q, Faure G, Gallet P, Kohler C, Bittencourt Mde C. Diagnostic and Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2016 Feb 2;6:20210.
- [31] Hristozova T, Korschak R, Stromberger Cet al. The presence of circulating tumor cells (CTCs) correlates with lymph node metastasis in nonresectable squamous cell carcinoma of the head and neck region (SCCHN). *Ann Oncol* 2011; 22:1878-1885.

- [32] Bozec A, Ilie M, Dassonville O et al. Significance of circulating tumor cell detection using the CellSearch system in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2013; 270:2745-2749.
- [33] Ghossein RA, Bhattacharya S, Rosai J. Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors. *Clin Cancer Res* 1999; 5:1950-1960.
- [33] Danila D. C. et al. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 13, 7053–7058 (2007).
- [35] Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N et al. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Res* 2011; 31:427-441.
- [36] Kulasinghe A, Perry C, Jovanovic L, Nelson C, Punyadeera C. Circulating tumour cells in metastatic head and neck cancers. *Int J Cancer.* 2015 Jun 1;136(11):2515-23.
- [37] Nichols AC, Lowes LE, Szeto CC et al. Detection of circulating tumor cells in advanced head and neck cancer using the CellSearch system. *Head Neck* 2012; 34:1440-1444.
- [38] Buglione M, Grisanti S, Almici C et al. Circulating tumour cells in locally advanced head and neck cancer: preliminary report about their possible role in predicting response to non-surgical treatment and survival. *Eur J Cancer* 2012; 48:3019-3026.
- [39] Balasubramanian P, Lang JC, Jatana KR et al. Multiparameter analysis, including EMT markers, on negatively enriched blood samples from patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *PLoS One* 2012; 7:e42048.
- [40] Grisanti S, Almici C, Consoli F et al. Circulating tumor cells in patients with recurrent or metastatic head and neck carcinoma: prognostic and predictive significance. *PLoS One* 2014; 9:e103918.
- [41] Weller P, Nel I, Hassenkamp P et al. Detection of circulating tumor cell subpopulations in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *PLoS One* 2014; 9:e113706.
- [42] Miller MC, Doyle GV, Terstappen LW. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *J Oncol* 2010; 2010:617421.
- [43] Riethdorf S, Fritsche H, Muller V et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res* 2007; 13:920-928.
- [44] He S, Li P, He S et al. Detection of circulating tumour cells with the CellSearch system in patients with advanced-stage head and neck cancer: preliminary results. *J Laryngol Otol* 2013; 127:788-793.
- [45] Wang H, Zhang G, Zhang H et al. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype and cancer stem cell-like properties in cisplatin-resistant lung cancer cells through AKT/beta-catenin/Snail signaling pathway. *Eur J Pharmacol* 2014; 723:156-166.
- [46] Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* 2006; 66:8319-8326.
- [47] Benali-Furet N, Wechsler JYF, Ezaoui SAM, Boitier FCA, Paraiso ICY. Ex vivo expansion of CTCs

- in culture isolated by size from patients with melanoma. ASCO, J Clin Oncol. 2012; 30(e21046).
- [48] Partridge M, Brakenhoff R, Phillips E et al. Detection of rare disseminated tumor cells identifies head and neck cancer patients at risk of treatment failure. Clin Cancer Res 2003; 9:5287-5294.
- [49] Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. Australasian Medical Journal 1869; 14: 146-7.
- [50] Kemshead JT, Hancock JP, Liberti PA. A model system for the enrichment of tumor cells from peripheral blood and bone marrow using immunomagnetic ferrofluids. Prog Clin Biol Res 1994; 389:593-600.
- [51] Racila E, Euhus D, Weiss AJ et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95:4589-4594.
- [52] Terstappen LW, Rao C, Gross S et al. Flow cytometry--principles and feasibility in transfusion medicine. Enumeration of epithelial derived tumor cells in peripheral blood. Vox Sang 1998; 74 Suppl 2:269-274.
- [53] Tibbe AG, Miller MC, Terstappen LW. Statistical considerations for enumeration of circulating tumor cells. Cytometry A 2007; 71:154-162.
- [54] Swennenhuis JF, Tibbe AG, Levink R, Sipkema RC, Terstappen LW. Characterization of circulating tumor cells by fluorescence in situ hybridization. Cytometry A 2009; 75:520-527.
- [55] Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E et al. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. Clin Cancer Res 2002; 8:2073-2084.
- [56] Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. Nat Rev Cancer 2003; 3:453-458.
- [57] Attard G, Swennenhuis JF, Olmos D et al. Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer. Cancer Res 2009; 69:2912-2918.
- [58] Greco A, Rizzo MI, De Virgilio A, Gallo A, Fusconi M, Pagliuca G, Martellucci S, Turchetta R, De Vincentiis M. Cancer stem cells in laryngeal cancer: what we know. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2016 Nov;273(11):3487-3495. Review.