



***Dottorato di Ricerca in Epato-Gastroenterologia Sperimentale e Clinica
(30° ciclo)***

Coordinatore Prof. Paolo Onori

A.A. 2016/2017

Titolo del progetto:

**“PROFILO DELLE CELLULE TUMORALI STAMINALI DI COLANGIOCARCINOMA
IN VITRO ED IN CIRCOLO: correlati clinico-patologici e prognostici”**

Relatore Prof. Domenico Alvaro

Correlatore: Dott. Vincenzo Cardinale

Dottorando: Dott. Anselmo Papa

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1. DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE

1.2. EPIDEMIOLOGIA

1.3. FATTORI DI RISCHIO

1.4. PATOGENESI MOLECOLARE

1.4.1. Modelli di cancerogenesi

1.4.2. Flogosi cronica

1.4.3. Vie mitogeniche

1.4.4. Apoptosi

1.4.5. Epigenetica

1.5. CLASSIFICAZIONE, SINTOMATOLOGIA, DIAGNOSI E STADIAZIONE

1.5.1. CLASSIFICAZIONE

1.5.2. SINTOMATOLOGIA

1.5.3. DIAGNOSI

1.5.4. STADIAZIONE

1.5.4.1. Colangiocarcinoma intraepatico (iCCA)

1.5.4.2. Colangiocarcinoma perilare (pCCA)

1.5.4.3. Colangiocarcinoma Distale (dCCA)

1.6. PROGNOSI E TERAPIA

1.6.1. PROGNOSI

1.6.2. TERAPIA

1.6.2.1. CHIRURGIA

1.6.2.1.1. Chirurgia del Colangiocarcinoma intraepatico

1.6.2.1.2. Chirurgia del Colangiocarcinoma extraepatico

1.6.2.2. TERAPIA ADIUVANTE

1.6.2.2.1. Chemioterapia e Chemio-Radioterapia
concomitante

1.6.2.2.2. Radioterapia esclusiva

1.6.2.3. TRATTAMENTO DELLA MALATTIA LOCALMENTE AVANZATA

1.6.2.3.1. Radio-Chemioterapia

1.6.2.3.2. Termoablazione

1.6.2.3.3. Chemioembolizzazione arteriosa (TACE)

1.6.2.3.4. La radioembolizzazione arteriosa (TARE)

1.6.2.3.5. Brachiterapia

1.6.2.4. TERAPIA DELLA MALATTIA SISTEMICA

2. TEORIA DELLE CANCER STEM CELL

2.1. CELLULE STAMINALI E CELLULE STAMINALI TUMORALI

2.2. CELLULE STAMINALI NEL FEGATO

2.3. CSC DEL COLANGIOCARCINOMA

3. TEORIA DELLE CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI (CTC)

3.1. Tecniche di isolamento delle CTC

3.1.1. CellSearch® - Veridex

3.1.2. SceanCell

4. PREMESSE E RAZIONALE DELLO STUDIO

4.1. CARATTERIZZAZIONE DELLE CSC

4.1.2. DCLK1

4.1.2.1. DCLK1 COME MARCATORE DI CELLULE STAMINALI E DI CSC

4.1.2.2. DCLK1 e CCA

4.2. DOSAGGIO DELLE CTC NELLA PRATICA CLINICA

4.2.1. CTC NEL COLANGIOCARCINOMA

5. SCOPO DEL PROGETTO

6. PAZIENTI, MATERIALI E METODI

6.1. CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DELLE CSC DI CCA

6.1.1. ALLESTIMENTO COLTURE PRIMARIE DI CCA

6.1.2. LINEE CELLULARI IMMORTALIZZATE

6.1.3. IMMUNOSELEZIONE o SEPARAZIONE MAGNETICA CON COLONNA LS

6.1.4. RT-QPCR

6.1.5. ESTRAZIONE, QUANTIZZAZIONE PROTEICA e WESTERN BLOT

6.1.6. IMMUNOFLUORESCENZA (IF)

6.1.7. COLTURE CELLULARI CON INIBITORE

6.1.8. SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE

6.1.9. POPULATION DOUBLING TIME

6.1.10. SAGGIO MTS

6.1.11. CURVA DOSE-RISPOSTA

6.1.12. METODI DI ANALISI STATISTICA

6.2. RICERCA CTC:

6.2.1. CellSearch – Veridex

6.2.1.1. LINEE CELLULARI DI CONTROLLO E
OTTIMIZZAZIONE DEI PARAMETRI

6.2.2. ScreenCell

7. RISULTATI

7.1. CARATTERIZZAZIONE CLINICA DELLA POPOLAZIONE DI PAZIENTI IN
STUDIO E TUMORALE ISTOMORFOLOGICA IN SITU

7.2. CARATTERIZZAZIONE CSC

7.2.1. ESPRESSIONE GENETICA DI DCLK1

7.2.2. ESPRESSIONE PROTEICA DI DCLK1

7.2.3. LOCALIZZAZIONE DI DCLK1

7.2.4. COLTURE CON INIBITORE E VALUTAZIONE DI VITALITÀ E
PROLIFERAZIONE

7.2.5. VALUTAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE IN SAGGIO MTS

7.2.6. VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE PER
CONCENTRAZIONI CRESCENTI DI INIBITORE DI DCLK1

7.3. Ricerca CTC: RISULTATI

7.3.1. CellSearch

7.3.1.1. Analisi per sottogruppi

7.3.2. ScreenCell

8. DISCUSSIONE

8.1. Caratterizzazione CSC

8.2. Ricerca CTC

9. CONCLUSIONI

9.1. Caratterizzazione CSC

9.2. Ricerca di CTC

10. TABELLE

11. FIGURE

12. BIBLIOGRAFIA

13. RINGRAZIAMENTI

1. INTRODUZIONE

1.1. DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE

Il colangiocarcinoma (CCA) è un tumore altamente maligno che fa parte del gruppo eterogeneo delle neoplasie delle vie biliari.

Il colangiocarcinoma a sua volta esiste nelle forme intraepatico (iCCA), extraepatico perilare (pCCA), extraepatico distale (dCCA).

In particolare, il CCA è una neoplasia primitiva maligna del fegato che può originare a qualsiasi livello dell'albero biliare, dai canali di Hering alle vie biliari principali (VBP), eccezion fatta per la colecisti e la papilla di Vater. Il CCA si presenta istologicamente come un adenocarcinoma ed il processo neoplastico può originare tanto dall'epitelio di rivestimento delle vie biliari, quanto dalle ghiandole peribiliari dell'albero biliare intra ed extraepatico [1;2].

1.2. EPIDEMIOLOGIA

Il CCA è, per incidenza, la seconda neoplasia maligna del fegato dopo l'epatocarcinoma e rappresenta il 3% di tutti i tumori dell'apparato gastrointestinale. Complessa è la raccolta di dati epidemiologici del CCA, in quanto non esiste un metodo di classificazione universalmente adottato, né molto spesso una diagnosi istologica certa.

Ad ogni modo, la distribuzione del CCA e dei rispettivi sottotipi è largamente disomogenea, che riflette l'esposizione ai diversi fattori di rischio: in Occidente, in Giappone e in Australia viene considerato un tumore raro (meno di 6 casi su 100'000 persone), mentre nel nord della Thailandia, in Korea e in alcuni paesi del Sud America l'incidenza si aggira intorno agli 80/90 casi su 100'000 [3].

Differenziando i vari sottotipi, l'iCCA è un tumore frequente in Oriente, a eccezione del Giappone, in cui la forma predominante è il pCCA, così come in Occidente. Tuttavia, recenti studi hanno evidenziato un aumento di incidenza e mortalità per la forma iCCA in molti paesi, Italia compresa. Al contrario, il pCCA e il dCCA risultano stabili o in diminuzione. Inoltre, senza fattori di rischio evidenziabili, il CCA è un tumore prevalentemente maschile, che colpisce soggetti tra i 60 e i 70 anni; differente invece il caso di pazienti con CSP, la cui età alla diagnosi di CCA si abbassa drasticamente tra i 30 e i 50 anni [4,5].

In Italia il CCA rappresenta meno dell'1% delle nuove diagnosi di neoplasia nella popolazione maschile e l'1,4% in quella femminile [6];

l'1,6 e il 2,9% della mortalità oncologica rispettivamente nel sesso maschile e femminile [7].

Secondo i più recenti dati epidemiologici disponibili, i tassi grezzi di incidenza sono di 6,7 e 7,6 casi/100.000 residenti/anno rispettivamente nelle popolazioni maschile e femminile; la mortalità si attesta rispettivamente sui 4,8 e i 6,1 casi/100.000 residenti/anno [7];

la sopravvivenza a 5 anni è del 21% nel sesso maschile e del 18% nel sesso femminile [6].

Per l'anno 2014 l'Associazione Italiana dei Registri dei Tumori (AIRTUM) stimava 2100 nuovi casi nella popolazione maschile e 2500 nella popolazione femminile, corrispondenti ad un tasso grezzo d'incidenza rispettivamente di 7,3 e 7,8 nuovi casi/100.000 residenti/anno. Il rischio cumulativo, ovvero la probabilità di ammalarsi nel corso della vita, è pari a circa 1 su 140 [6].

Sul piano temporale, a partire dagli anni '90, l'incidenza ha mostrato una diminuzione nel sesso femminile, mentre nel sesso maschile non ha subito variazioni oltre la soglia della significatività statistica; nello stesso periodo (1996- 2010), la mortalità è rimasta stabile in entrambi i sessi [6]. La stratificazione del rischio per età, pressoché nullo sino ai 40 anni, a partire da quest'età evidenzia un incremento costante dell'incidenza, raggiungendo i valori massimi nell'età avanzata, oltre i 65 anni [7,8].

1.3. FATTORI DI RISCHIO

Sebbene la maggior parte delle diagnosi di CCA non permetta di mostrare correlazioni con cause direttamente connesse, sono stati evidenziati fattori di rischio certi. La patogenesi del CCA si riconduce difatti a uno stato di flogosi cronica delle vie biliari che favorisce la cancerogenesi, inducendo il danno a carico del DNA, inibendo i meccanismi pro-apoptotici e promuovendo la proliferazione e la neo-angiogenesi [9,10]. Le citochine infiammatorie come il TNF α e l'IL-6 sono in grado di attivare l'iNOS (forma inducibile dell'ossido nitrico sintasi) e aumentare l'NO nei colangiociti, promuovendo la nitrosilazione del DNA e quindi lo sviluppo di mutazioni. A questo processo si associa il ruolo della stasi biliare e dell'azione aggressiva degli acidi biliari, che agiscono come modulatori di proliferazione e apoptosi cellulare e promuovono l'infiammazione.

Gli studi ad ora realizzati che analizzano i fattori di rischio non tengono conto della differenza tra iCCA, pCCA, dCCA e pertanto i fattori di rischio propri di ogni singolo sottotipo non sono perfettamente definiti [11].

Tuttavia, in Oriente la così alta incidenza di iCCA è da ricondursi a infezioni endemiche croniche da parassiti intraepatici come *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini* e schistosomiasi, oltre che alle scarse risorse igieniche e sanitarie che impediscono un intervento terapeutico. In Occidente la CSP è strettamente correlata allo sviluppo di CCA intra ed extraepatici, ma a livello clinico ed epidemiologico non è rilevante, poiché è una malattia rara. Più influente è il ruolo delle infezioni virali croniche da HCV e HBV, in forte associazione con l'iCCA. Ciononostante, la terapia antivirale e lo stretto follow-up del paziente, in Occidente, ha impedito che l'incidenza di iCCA raggiungesse i valori dell'Asia, che oltre ai parassiti delle vie biliari, conta un altissimo numero di soggetti con HBV+. Recenti studi hanno evidenziato una correlazione tra CCA e sindrome metabolica, punto importante da approfondire visto la dilagante crescita di soggetti obesi in Occidente [5]. Epatolitiasi, colelitiasi, malattie cistiche e alterazioni congenite dell'anatomia delle vie biliari (malattia di Caroli) rappresentano altri fattori di rischio per il CCA, soprattutto nella sua forma pCCA. Inoltre, l'esposizione ad alcune tossine è associata allo sviluppo di CCA, come ad esempio il Thorotrast, un mezzo di contrasto radioattivo ora non più in uso, cancerogeno al decadimento del Torio, o la diossina, prodotta da processi di combustione e ubiquitaria nell'ambiente [3].

1.4. PATOGENESI MOLECOLARE

1.4.1. Modelli di cancerogenesi

Il fegato è un organo da una elevata capacità rigenerativa e possiede cellule progenitrici a doppio potenziale che possono dare origine ad epatociti o colangiociti, a loro volta suscettibili di trasformazione maligna in epatocarcinomi e colangiocarcinomi seguendo

modelli di tumorigenesi molto simili. A sostegno dell'ipotesi della cancer stem cell [12], l'analisi istopatologica e il profiling genetico permettono di individuare due categorie che presentano caratteristiche miste, l'hepatocellular-cholangiocarcinoma (CHC), di probabile derivazione dal precursore bipotente [13,14] e il cholangiocarcinoma-like hepatocellular carcinoma (CLHCC) [15].

Infatti, a seconda del grado di differenziamento raggiunto prima dell'arresto maturativo, si possono osservare tumori con fenotipo eterogeneo. Ipotesi alternativa per la cancerogenesi biliare è il modello dell'evoluzione clonale, processo multifase di sviluppo tumorale dalle lesioni precancerose al carcinoma invasivo, spinto dal progressivo accumulo di alterazioni genetiche ed epigenetiche a partire da un contesto infiammatorio cronico [16,17].

Nel tradizionale modello di colangiocarcinogenesi, la promozione tumorale consegue ad un background di colestasi e/o flogosi biliare cronica: l'elevato turnover cellulare e l'abbondante rilascio di citochine facilitano l'accumulo di mutazioni e la proliferazione di cellule con alterazioni genetiche. Ad esempio, AID (Activation-Induced hystidine Deaminase), enzima coinvolto nella sintesi degli acidi nucleici e dotato di effetto mutageno, è indotta da citochine infiammatorie ed è riscontrata in alte concentrazioni nei colangiocarcinomi, con conseguente induzione di mutazioni somatiche a carico di MYC, TP53 e p16INK4a [18].

D'altra parte, attraverso alterazioni simili a quelle prodotte dalla flogosi cronica, l'oncogenesi può verificarsi anche in assenza di infiammazione: un recente lavoro [19] ha ripartito su base molecolare i colangiocarcinomi intraepatici in due classi principali, dotati di distinti profili genomici e comportamento clinico. La classe infiammatoria è caratterizzata dall'attivazione delle vie infiammatorie, dall'abbondante produzione di citochine (IL-6, IL-10, IL-17) e dall'iperattivazione di STAT3. Nella classe proliferativa (60%), invece, sono potenziate le vie mitogeniche, quali RAS, MAPK e Met, e si caratterizza per un peggiora evoluzione di malattia. La patogenesi del carcinoma della colecisti ripercorre sostanzialmente quella del colangiocarcinoma, dipendente anch'essa dai medesimi meccanismi: le citochine con un ruolo anche per l'IL-1, le vie mitogeniche, il TGF β e la perdita degli oncosoppressori e dei regolatori del ciclo cellulare.

1.4.2. Flogosi cronica

La principale citochina coinvolta nella via infiammatoria alla tumorigenesi è l'IL-6, altamente iperespressa nelle linee cellulari e rinvenuta ad alti livelli tissutali nel colangiocarcinoma. Il legame col recettore di membrana (IL-6R) attiva le chinasi Janus (Jak1, Jak2, Tyk1), le quali fosforilano modulatori della trascrizione come STAT3. La proteina STAT3 fosforilata dimerizza componendo un fattore di trascrizione che induce diversi geni tra cui Mcl-1 che riduce la sensibilità cellulare ai meccanismi di apoptosi mediati da TRAIL [20].

IL-6 media anche, attraverso la fosforilazione di ERK1/2, la sintesi di fattori di crescita come progranulina, che promuove la proliferazione cellulare tramite la cascata di Akt [21]. In condizioni fisiologiche SOCS-3 controlla un ciclico feedback negativo sulla produzione di IL-6, ma nel colangiocarcinoma il gene che codifica per SOCS-3 è silenziato dalla metilazione del promotore da parte di DNMT1, metil-transferasi la cui trascrizione è pure indotta dall'IL-6 via microRNAs [22].

Altri bersagli del silenziamento epigenetico operato da DNMT1 sono gli oncosoppressori RASSF1A, APC e p16INK4a, ma il ciclo cellulare viene deregolato dall'IL-6 anche per via diretta con l'attivazione della MAPK p38, che riduce i livelli di p21Waf1, con progressione oltre il checkpoint G1/S [23-25].

La stimolazione citochinica aberrante pertanto contribuisce, indipendentemente dalle mutazioni somatiche su oncogeni ed oncosoppressori, ad una varietà di meccanismi coinvolti nell'oncogenesi: resistenza all'apoptosi, proliferazione, perdita di controllo del ciclo cellulare [26].

Altri mediatori del danno cellulare indotto dalla flogosi cronica sono il monossido d'azoto (NO) e la ciclo-ossigenasi 2 (COX-2). La concentrazione NO viene incrementata dall'isoforma inducibile della NO sintetasi (iNOS), provocando danno ossidativo e nitrosativo, che contrasta i processi di riparazione del DNA e consente l'accumulo di mutazioni. La COX-2, enzima inducibile deputato alla conversione dell'acido arachidonico in prostaglandina H₂, precursore dei trombossani e delle altre prostaglandine, è un comune mediatore infiammatorio e risulta up-regolata in diverse neoplasie. In particolare nel colangiocarcinoma fornisce l'anello di congiunzione tra la colestasi e la flogosi cronica: gli ossisteroli, derivati ossigenati del colesterolo che si concentrano nella bile colestatica, stabilizzano l'mRNA della COX-2 nei colangiociti umani [27].

Attraverso l'aumento della concentrazione della prostaglandina E₂, l'accumulo di COX-2 provoca aumento della proliferazione e resistenza all'apoptosi, in linee cellulari di colangiocarcinoma [28-30].

1.4.3. Vie mitogeniche

Il secondo meccanismo importante della colangiocarcinogenesi è rappresentato dalle vie di segnalazione a partenza dai recettori della famiglia ErbB.

Alterazioni genetiche a carico di EGFR (ErbB1), di Her-2/Neu (ErbB2) e di alcuni dei loro principali trasduttori come BRAF e KRAS sono state descritte in alcuni studi europei. Questi studi hanno evidenziato in alcuni casi differenze rilevanti rispetto a casistiche asiatiche suggerendo che una differente distribuzione geografica dei fattori predisponenti la cancerogenesi biliare possa spiegare questa variabilità [31].

In particolare, mutazioni attivanti di EGFR sono state descritte nel 15% dei casi [32] e l'iperespressione nel 16% [33]. Her-2 è iperespresso nel 25% dei colangiocarcinomi extraepatici [34-36].

In casistiche occidentali mutazioni di KRAS e BRAF sono state riscontrate rispettivamente nel 6-19% dei casi e nel 5-22% dei casi [37]. Appaiono mutate in misura minore PIK3CA (4-9%) e PTEN (4%) [38].

È da sottolineare che, in realtà, i due meccanismi, infiammatorio e mitogenico, non sono paralleli né nettamente l'un l'altro alternativi: la loro interrelazione è intricata, con collegamenti ad ogni livello. Ad esempio, sussiste una correlazione fortemente positiva tra i livelli di COX-2 e l'intensità di colorazione all'immunoistochimica di ErbB2 [39];

tramite il recettore EP1 e l'oncogene Src la prostaglandina E₂ attiva la via delle MAPK [40] e, coerentemente, il blocco farmacologico di COX-2 riduce i livelli di EGFR attivato [41].

Modelli murini con costitutiva espressione di ErbB2 nell'albero biliare sviluppano un adenocarcinoma attraverso l'iperespressione di COX-2 [42].

L'attivazione di una via, pertanto, sembra possa facilitare anche altre vie, inclusi Met e VEGF. Questa complessa interrelazione, sebbene renda impegnativa la dissezione dei percorsi molecolari che portano al cancro delle vie biliari, suggerisce per i farmaci bloccanti la via dell'EGFR un meccanismo d'azione più ampio del semplice blocco della via delle MAPK p42/44. Per quanto riguarda Met, nel colangiocarcinoma stimola la migrazione e l'invasione in linee cellulari e la sua iperespressione correla con la sovraregolazione dei membri della famiglia ErbB e con una peggiore prognosi [43]. L'iperespressione di VEGF e di VEGFR media la risposta proliferativa dei colangiociti alla colestasi e potrebbe accelerare, attraverso un ciclo autocrino, la proliferazione delle cellule neoplastiche e la neoangiogenesi tumorale [44-46].

1.4.4. Apoptosi

Unitamente allo stimolo proliferativo, la cancerogenesi biliare chiama in causa i meccanismi di evasione dell'apoptosi. Nel colangiocarcinoma la soppressione dei normali meccanismi di eliminazione delle cellule che accumulano danno genetico coinvolge generalmente p53, proteina responsabile dell'arresto del ciclo cellulare in caso di danno al DNA, le proteine anti-apoptotiche Bcl-2, Bcl-Xl e Mcl-1 e, nel carcinoma della colecisti, le proteine pro-apoptotiche quali Bif-1 e DCC [47].

La perdita di p53, osservata nel 20- 80% dei casi a seconda della sede e dell'area geografica [48], è dovuta non solo a mutazioni puntiformi e perdita della eterozigosi, ma talvolta all'accumulo di proteina wild-type insieme al suo inibitore mdm-2. Tale evento risulta nella perdita di controllo del ciclo cellulare, in una riduzione degli eventi apoptotici e nell'accumulo di ulteriori mutazioni, costituendo pertanto un passaggio critico nella cancerogenesi delle vie biliari. Nel carcinoma della colecisti, la perdita di p53, è una tappa frequentemente percorsa durante le fasi precoci dell'oncogenesi e difatti rilevata anche in lesioni precancerose [59].

La regolazione dell'entrata nel ciclo cellulare coinvolge anche gli inibitori dei complessi CDK-ciclina, quali p21WAF1, p16INK4a e p27Kip1, alterati frequentemente nel colangiocarcinoma [50].

1.4.5. Epigenetica

Recentemente è stata dimostrata l'esistenza di una serie di alterazioni epigenetiche cruciali nella cancerogenesi biliare. Oltre al sopracitato ruolo di DNMT1, nel colangiocarcinoma intraepatico, si rinvencono mutate le due isoforme dell'isocitrato deidrogenasi (IDH), enzima chiave nello scambio anaerobico (effetto Warburg) e nella inibizione di numerosi enzimi coinvolti nella regolazione trascrizionale per via epigenetica (istone demetilasi, 5-metil-citosina idrossilasi, etc.) da parte dell'oncometabolita aberrante 2- idrossiglutarato [51-53].

Altri geni coinvolti nella modifica di istoni e nella coattivazione trascrizionale, portatori di mutazioni nel colangiocarcinoma intraepatico, includono MLL3 [54], BAP1 e due subunità del complesso derepressore della trascrizione SWI/SNF-B (ARID1A e PBRM-1) [55].

I geni silenziati sono coinvolti in una varietà di funzioni, fra cui apoptosi o arresto della crescita (p73, DAPK), riparazione del DNA (hMHL1, MGMT), differenziamento (RAR β), regolazione del ciclo cellulare (14-3-3 σ , p14ARF, p15INK4b, p16INK4a), contrasto allo

stress ossidativo (glutathione S-transferasi, GSTP1), inibizione dell'infiammazione (SOCS3), adesione cellulare (E-caderina), oncosoppressione (Semaphorin3B, metilata nel 100% dei colangiocarcinomi; APC, RASSF1A, RUNX3) [56,57].

Il silenziamento di alcuni di tali geni avviene con una frequenza differenziale secondo la sede di malattia: ad esempio, GSTP1 è più comunemente metilato nella malattia intraepatica, mentre RASSF1A nel colangiocarcinoma extraepatico [57].

1.5. CLASSIFICAZIONE, SINTOMATOLOGIA, DIAGNOSI E STADIAZIONE

1.5.1. CLASSIFICAZIONE

La classificazione del CCA è da sempre molto dibattuta e tuttora si stenta a individuare un metodo elettivo. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) (WHO) [76] e l'American Joint Cancer Committee/Union for International Cancer Control (AJCC/UICC) [77] hanno proposto la classificazione del CCA, a seconda della sede, nei seguenti tipi: a) colangiocarcinoma intraepatico (o periferico) (iCCA), quando si trova prossimalmente ai dotti biliari di secondo ordine (fino al 20% dei CCA), b) colangiocarcinoma peri-ilare (pCCA, anche chiamato tumore di Klatskin) [78], quando si trova in sede extraepatica nella zona compresa tra i dotti biliari di secondo ordine e l'impianto del dotto cistico (fino al 60% dei CCA) e c) colangiocarcinoma distale (dCCA) quando limitato alla zona extraepatica tra l'origine del dotto cistico e la papilla di Vater (fino al 20% dei CCA). Il 5% è multifocale [79-86].

A fini delle rilevazioni epidemiologiche è raccomandabile evitare misclassificazioni e definire i sottotipi secondo la classificazione OMS come iCCA, pCCA e dCCA [84-87]. (Fig. 1), [2-5].

La modalità di crescita dell'iCCA è nella maggior parte dei casi formante-massa, specialmente per tumori originanti dalle vie biliari di piccolo calibro, raramente può essere osservata anche una crescita di tipo periduttale-infiltrante e intraduttale, tipica delle neoplasie intraepatiche dei dotti di calibro maggiore. Per quanto riguarda i p-CCA e i d-CCA si possono osservare pattern di crescita periduttale-infiltrante e intraduttale, ma in più dell'80% dei casi i p-CCA si presentano con una forma mista nodulare+periduttale-infiltrante. La forma intraduttale ha una crescita di tipo papillare, mentre la forma periduttale-infiltrante si sviluppa longitudinalmente al dotto biliare e può causare tanto stenosi del dotto stesso, quanto infiltrazione del parenchima epatico circostante. Si è osservato che il periduttale infiltrante deriva da lesioni precancerose quali la neoplasia biliare intraepiteliale, la neoplasia papillare intraduttale, la neoplasia cistica mucinosa e la neoplasia tubulare intraduttale [3]. Non sono conosciute altrettante forme precancerose per la variante formante-massa. Al contrario è però strettamente associata a malattie epatiche croniche non biliari. A queste modalità di classificazione esclusivamente topografica bisogna aggiungere una caratterizzazione di tipo istologico, proposta da Komuta *et al.* nel 2012 [9], che divide i colangiocarcinomi nelle forme mucinosa e mista (Fig. 2).

La forma mista origina dall'epitelio cubico non secernente che riveste i dotti biliari. A livello istologico il colangiocarcinoma misto è caratterizzato da aree a differenziazione epatocitaria e aree di reazione tubulare, mentre a livello clinico è sovrapponibile all'iCCA. La forma mucinosa ha invece un pattern di crescita di tipo periduttale-infiltrante o

intraduttale, è spesso associata a colangite sclerosante primitiva (CSP) e origina dai dotti biliari di maggior calibro, distali ai segmentali. In tale sede si osserva una progressiva perdita dell'epitelio cubico duttulare, sostituito con un epitelio cilindrico mucino-secerne, nell'ambito del quale si trovano le ghiandole peribiliari (PBG). È proprio da queste cellule che origina la forma mucinosa del CCA, istologicamente paragonabile a un adenocarcinoma [9]. Pertanto l'iCCA può essere tanto un CCA misto, prossimale e formante-massa, quanto, seppur più raramente, un CCA mucinoso, distale, a origine dai dotti biliari di calibro maggiore, mentre le forme pCCA e dCCA sono mucinose nella quasi totalità dei casi. Essenziale è questa differenziazione per la sintomatologia, la stadiazione e la prognosi dei pazienti affetti.

Recentemente, è stato inserito nella classificazione WHO un sottotipo distinto di iCCA, il carcinoma combinato epato-colangiocellulare (CHC), che riunisce le caratteristiche dell'epatocarcinoma (HCC) e del CCA [88-90, 9], e rappresenta circa lo 0,8- 14% di tutti i tumori primitivi del fegato [91, 9].

Questa categoria, precedentemente classificata come un sottotipo di iCCA, include anche il carcinoma colangiocellulare (CLC) e comprende uno spettro di carcinomi epatici primitivi che mostrano differenziazione bi-fenotipica. Le caratteristiche bi-fenotipiche del CHC sono ancora in studio; si pensa che origini dalle cellule progenitrici epatiche, con sede nei canali di Hering, in grado di differenziarsi sia in epatociti e in colangiociti, oppure dalla de-differenziazione di epatociti maturi. Pertanto, il CHC conterrebbe zone sia simil-HCC sia mucino-secerne all'interno dello stesso tumore. Possiederebbe le caratteristiche macroscopiche della componente HCC per la sua propensione a infiltrarsi nel sistema portale, e quella dell'iCCA per la sua tendenza a metastatizzare ai linfonodi. L'aggressività neoplastica (infiltrazione vascolare e metastasi linfonodali) è simile agli iCCA puri, maggiore di quanto si osserva nell'HCC.

1.5.2. SINTOMATOLOGIA

La sintomatologia del CCA è nettamente diversa a seconda della localizzazione e spesso un quadro clinico evidente è osservabile soltanto in una malattia di stadio avanzato. Nella maggior parte dei pCCA e dei dCCA la malattia esordisce con ittero indolente, con o senza febbre e dolore, feci ipo/acoliche e urine ipercromiche. Il quadro sintomatologico si correla a un pattern biochimico suggestivo di colestasi, con iperbilirubinemia prevalentemente diretta e aumento dei valori di fosfatasi alcalina e γ -GT, determinata da stenosi e conseguente ostruzione delle vie biliari extraepatiche. In altri casi può essere osservabile una patologia più sfumata, caratterizzata da nausea, vomito, astenia, dolore in ipocondrio destro, più tipica degli iCCA: infatti le formazioni intraepatiche nel 98% dei casi si comportano come una LOS e l'ittero è presente solo nel 28% dei casi [92;93].

1.5.3. DIAGNOSI

Così come per la sintomatologia, anche la diagnosi del CCA è differente a seconda che sia intra- o extra-epatico. Nel 20-25% dei casi l'iCCA viene diagnosticato incidentalmente, dopo il ritrovamento generalmente ecografico di un nodulo intraepatico. In questi casi bisogna primariamente escludere eventuali metastasi epatiche e un HCC, soprattutto se la

lesione insorge su fegato cirrotico. Tramite la tomografia computerizzata (TC) con mezzo di contrasto o risonanza magnetica (RM), si può fare diagnosi definitiva di HCC, grazie al peculiare comportamento di questo tumore, che è caratterizzato da un rapido wash in e un rapido wash out. L'iCCA invece presenta alternativamente una progressiva captazione del mezzo di contrasto o un coinvolgimento vascolare ad anello. Tuttavia, per neoplasie di diametro inferiore a 3 cm, in cui l'imaging non è sempre risolutivo, o per noduli insorti su fegato sano la diagnosi certa avviene sempre tramite la biopsia epatica [3]. Il dCCA e pCCA sono solitamente diagnosticati dopo sospetto clinico, biochimico e/o ecografico di ostruzione delle vie biliari. L'identificazione della lesione in questo caso si effettua preferibilmente tramite la RM addome o la colangiopancreatografia-RM (CP-RM). Per una diagnosi definitiva è necessario un prelievo di cellule tumorali; per questo motivo i pazienti sono spesso sottoposti a colangiopancreatografia retrograda endoscopica (CPRE) in associazione a numerose altre procedure come la citologia biliare, lo spazzolamento e le biopsie endoscopiche. La sensibilità è comunque molto bassa, motivo per cui più del 40% dei pazienti viene inviato alla resezione chirurgica senza diagnosi definitiva, e il 10% dei soggetti non evidenziano presenza di malattia sui tessuti resecati [3].

1.5.4. STADIAZIONE

I diversi tipi di CCA richiedono differenti sistemi di stadiazione avendo diverse strategie di trattamento e manifestazioni radiologiche [94].

1.5.4.1. Colangiocarcinoma intraepatico (iCCA)

L'imaging preoperatorio per l'iCCA dovrebbe includere la TC con mezzo di contrasto o la RM/MRCP. La funzione epatica dovrebbe essere attentamente valutata nei pazienti cirrotici, e nei casi di ridotta funzionalità epatica, i limiti della resezione chirurgica dovrebbero essere valutati con i medesimi criteri raccomandati per l'HCC [95].

Sia la TCMD che la RM sono appropriate per la stadiazione del tumore e per la valutazione volumetrica del potenziale fegato residuo. Nella previsione di resecabilità, la TCMD è più precisa della RM, avendo un'accuratezza dell'85-100%; è superiore per identificare metastasi extraepatiche e per documentare l'infiltrazione vascolare [96].

L'imaging ha una capacità limitata di determinare l'estensione intraduttale del tumore e la resecabilità, in particolare per l'iCCA periduttale-infiltrativo.

Nella valutazione pre-chirurgica la FDG-PET può identificare metastasi linfonodali e a distanza altrimenti misconosciute nei pazienti con malattia potenzialmente operabile [97-100].

Secondo alcune esperienze l'utilizzo della FDG-PET ha cambiato il management chirurgico fino nel 30% dei pazienti [101, 102].

In particolare, l'uso della FDG-PET nel setting preoperatorio è stato inoltre valutato in uno studio prospettico effettuato da Kim et al. su 123 pazienti [98] con sospetto iCCA in cui la FDG-PET ha dimostrato di superare la TC da sola nell'individuazione preoperatoria di metastasi linfonodali e a distanza; la FDG-PET ha determinato un cambio di scelta terapeutica in 15 pazienti.

I sistemi di stadiazione esistenti sono: l'AJCC/ UICC alla sua VII edizione (Tabella 1) [103,104], il TNM [105] quello del Gruppo di Studio Liver Cancer of Japan (LCSGJ) [106] e il National Cancer Center of Japan (NCCJ) [107]. La principale differenza tra questi sistemi

di stadiazione consiste nella stadiazione del T. Lo staging AJCC/UICCA nella VII edizione introduce una stadiazione specifica per l'iCCA adottando le numerose proposte di precedenti studi [103], ed è stato convalidato da un'indipendente studio di coorte retrospettiva di Farges et al. che ha mostrato una buona correlazione con la prognosi in un sottogruppo di 163 pazienti sottoposti a resezione con esito curativo (R0) di iCCA con linfoadenectomia ed esclusione di istologica di componente tumorale epatocellulare [108].

La dimensione del tumore >5 cm non è inclusa in quanto, nonostante alcuni studi lo indicassero fattore prognostico per la sopravvivenza [109, 110] molti altri studi non ne hanno confermato la predittività indipendente di sopravvivenza. La valutazione del T si basa sul numero delle lesioni, sull'invasione vascolare, sulla presenza di metastasi intraepatiche e sull'invasione delle strutture adiacenti [111].

Tuttavia, richiede la valutazione istologica per il Tis (carcinoma in situ) e lo stadio T4, e quindi non è affidabile per la stadiazione preoperatoria. Specificamente, i tumori classificati come T1 sono solitari senza invasione vascolare; il T2 include tumori multipli (e.g. malattia multifocale, noduli satelliti, metastasi intraepatiche) così come tumori associati ad ogni tipologia di invasione micro- o macrovascolare; il T3 include tumori che invadono direttamente le strutture adiacenti; il T4 include tumori con qualunque tipo di componente periduttale infiltrante. I tumori multipli sono classificati come T2b anche se è difficile distinguere la malattia multifocale da una lesione dominante con metastasi intraepatiche. Le metastasi linfonodali locoregionali, che coinvolgono linfonodi ilari, periduodenali e peripancreatici sono classificate come N1; le metastasi a distanza sono classificate come M1. Metastasi linfonodali regionali, ilari, periduodenali e peripancreatici per l'emifegato destro, e ilari e gastroepatici per il sinistro sono un predittore indipendente di sopravvivenza e sono, quindi, inclusi in tutti i sistemi di stadiazione. L'impegno dei linfonodi celiaci, periaortici o cavali è considerato come metastasi a distanza (M1).

1.5.4.2. Colangiocarcinoma perilare (pCCA)

Nel pCCA, la classificazione Bismuth-Corlette è quella più utilizzata per programmare il giusto approccio derivativo poiché valuta l'estensione tumorale longitudinale (Bismuth). Questa distingue quattro tipi di pCCA in base alla loro estensione perilare: tipo I, tumore confinato al dotto epatico comune; tipo II, tumore limitato alla confluenza degli epatici, senza coinvolgimento dei dotti secondari; tipo III, tumore che coinvolge la confluenza con estensione al dotto epatico di destra (IIIA) o di sinistra (IIIB); tipo IV, interessa la confluenza biliare con il coinvolgimento dei dotti intraepatici secondari su entrambi i lati. Questo sistema è utilizzato per pianificare il trattamento chirurgico, dalla resezione (tipo I e II) a un'epatectomia maggiore (tipo III). Il tipo IV è tradizionalmente considerato non chirurgico, tranne che per il trapianto di fegato [112] ma, di recente, la chirurgia curativa è stata tentata anche nei tumori di tipo IV che si estendono a ritroso per meno di 2 cm dall'ilo. Tuttavia, il sistema di classificazione Bismuth-Corlette manca d'informazioni importanti per la resecabilità quali l'infiltrazione vascolare, la diffusione metastatica linfonodale locale o a distanza, e l'atrofia epatica lobare e pertanto questo sistema non ha un valore prognostico e non correla con i risultati di sopravvivenza [113, 114]; inoltre, in alcuni casi, una precisa classificazione Bismuth-Corlette può essere di difficile definizione all'imaging per la scarsa delimitazione dell'estensione longitudinale in caso d'infiltrazione subepiteliale nelle forme infiltranti e di estensiva diffusione mucosa nelle forme polipoidi

papillari [115].

La classificazione proposta dal Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) dettaglia tre fattori legati all'estensione del tumore: la posizione e l'estensione del coinvolgimento biliare, l'invasione venosa portale e l'atrofia lobare epatica, indipendentemente da metastasi linfonodali o a distanza, ed è utilizzata per la selezione dei pazienti per la chirurgia [116,117].

Zervos et al. hanno rivalutato una versione preliminare del sistema di staging MSKCC e non hanno trovato alcuna correlazione tra gli stadi T e resecabilità e sopravvivenza [114].

Nella 7° edizione del sistema di stadiazione AJCC/UICC, il pCCA è stadionato come una entità distinta basandosi sulla stadiazione anatomo-patologica (TNM patologico) (Tabella 2). Il sistema AJCC considera anche il coinvolgimento della vena porta e dell'arteria epatica, l'impegno linfonodale e le metastasi a distanza. E' principalmente utilizzato come sistema di stadiazione postoperatoria e ha un'utilità minima per valutare la resecabilità in fase pre-operatoria. Un tumore in stadio iniziale (T1) è limitato alla parete del dotto biliare. Il più delle volte, i tumori T1 sono papillare o polipoide, anche di grandi dimensioni. All'imaging, questo tumore si presenta come un allargamento del lume biliare o come ispessimento della parete del dotto biliare, e il tessuto adiposo periduttale è intatto. Tumori T2 si estendono oltre la parete del dotto biliare, invadendo il grasso periduttale (T2a) o il fegato (T2b), e spesso si presentano come forme infiltrative periduttali o come massa nodulare mostrando irregolare ispessimento della parete duttale con una maggiore enhancement. All'imaging, la distinzione tra fasi T1 e T2 è difficile poiché la determinazione del bordo del dotto biliare può essere difficile, anche istologicamente. Lo stadio T3 include lesioni localmente invasive che coinvolgono fegato, colecisti, pancreas, o vena porta omolaterale o dell'arteria epatica. Lo stadio T4 include i tumori ampiamente invasivi, con estensione alla vena porta bilaterale o del tronco principale, l'arteria epatica comune, l'estensione vascolare controlaterale, e il coinvolgimento dei dotti biliari di secondo ordine o di organi adiacenti.

Tuttavia, nella corrente gestione chirurgica, un'invasione focale di meno di 2 cm di lunghezza del tronco portale principale non necessariamente indica la non resecabilità, ma indica la resezione curativa della vena porta coinvolta con posizionamento di graft venoso. Il coinvolgimento del parenchima epatico è classificato come T2 invece di T3 poiché il coinvolgimento parenchimale da solo ha una prognosi migliore rispetto al coinvolgimento vascolare unilaterale. Numerose esperienze hanno dimostrato imprecisioni nella valutazione della sopravvivenza dal sistema AJCC, che possono, in parte, essere dovute al non aver tenuto conto della profondità dell'invasione tumorale [118].

Dati i limiti dei vari sistemi di stadiazione e la difficoltà nel confrontare i risultati in vari centri, DeOliveira e un panel internazionale di esperti hanno introdotto un nuovo sistema di stadiazione per il pCCA dal punto di vista chirurgico, che comprende anche nuovi fattori per migliorare e standardizzare la determinazione della prognosi e la refertazione del tumore [119]. Questo nuovo sistema è derivato dalla classificazione Bismuth-Corlette per la valutazione del coinvolgimento dell'albero biliare, ma considera anche: a) le dimensioni del tumore (diametro >1 cm, 1-3 cm, o ≥ 3 cm, la scelta di un cut-off di tre centimetri per lo stadio T3 si basa su recenti dati che indicano una prognosi migliore per i tumori più piccoli); b) morfologia del tumore: periduttale o nodulare sclerosante o mass-

forming, intraduttale o polipoide, e mista; c) grado e specifica posizione dell'infiltrazione dell'arteria epatica e dell'encasement della vena porta (coinvolgimento del vaso di oltre 180° sulla circonferenza del vaso indica encasement); d) atrofia lobare epatica e volume del potenziale residuo fegato (future liver remnant: FRL), e) altre malattie del fegato, che sono un importante fattore di rischio per la chirurgia; f) lo stato dei gruppi linfonodali ilari; g), la presenza di metastasi a distanza, tra cui fegato e metastasi peritoneali. Pertanto, questa stadiazione è applicabile nel contesto pre-operatorio e comprende ben stabiliti fattori prognostici. L'inclusione del tipo di crescita macroscopica tumorale non è mai stato incluso in altri sistemi di stadiazione ed è stato dimostrato di essere un fattore predittivo per la sopravvivenza [120].

Tuttavia, questo sistema di stadiazione è piuttosto complicato e comprende anche alcuni fattori prognostici non ancora validati, come le dimensioni del tumore, l'atrofia lobare e il criterio volumetrico che è più un fattore per la resezione che un fattore prognostico [116].

Ulteriori punti di critica comprendono i criteri di coinvolgimento vascolare, come ad esempio il coinvolgimento a 180° e la derivazione del coinvolgimento vascolare dal coinvolgimento biliare [120]. La validità di questo nuovo sistema ha ancora bisogno di verifica in ampi studi prospettici.

Meno del 50% dei CCA sono resecabili [118].

Entrambe le estensioni longitudinali e laterali del tumore, che includono l'invasione vascolare o l'espansione ai tessuti molli, come valutato nella stadiazione T dell'AJCC, sono importanti per determinare la resecabilità del tumore [121].

Criteri di non resecabilità [116,122] sono:

- 1) estensione del tumore ai dotti biliari secondari bilateralmente, che esclude una anastomosi bilio- enterica;
- 2) infiltrazione o occlusione del tronco portale principale prossimale alla sua biforcazione;
- 3) atrofia di un lobo epatico con ramo portale controlaterale infiltrato o occlusione estesa più di 2 cm, che impedisce di eseguire una anastomosi libera da malattia;
- 4) atrofia di un lobo epatico con estensione controlaterale del tumore ad una confluenza secondaria a più di 2 cm dall'ilo epatico;
- 5) invasione arteria epatica controlaterale;
- 6) estensione unilaterale del tumore di dotti biliari secondari con infiltrazione o occlusione controlaterale della vena porta;
- 7) malattia metastatica. Metastasi istologicamente dimostrate ai linfonodi oltre il legamento epatoduodenale sono considerati malattia non suscettibile di resezione potenzialmente curativa. Al contrario, metastasi entro il legamento epatoduodenale non costituiscono criterio di non resecabilità. Metastasi del polmone, del fegato, o metastasi peritoneali sono criteri di non resecabilità.

Il numero di studi dedicati alla performance delle tecniche d'imaging nella stadiazione e definizione della resecabilità del pCCA è scarso e la loro qualità metodologica modesta [123].

L'US è l'indagine di primo livello per la valutazione di un ittero ostruttivo ed è utile per identificare l'ostruzione meccanica, confermare se è presente dilatazione biliare o per

valutare la presenza o l'assenza di calcoli, identificare l'estensione dell'ostruzione con una sensibilità del 55-95% e una specificità del 71-96% [124,125].

L'US è meno efficace della MDTC o della MRCP e delle metodiche colangiografiche dirette per definire la sede e la causa di ostruzione [124-127].

La TC con mdc è raccomandata come modalità di prima istanza per la valutazione dei pazienti con alta probabilità di malignità [127]; è utile per la diagnosi e per documentare l'estensione locale del tumore e l'invasione vascolare, importanti per la pianificazione terapeutica [128].

Nel CCA senza ispessimento delle pareti delle vie biliari, è difficile solo attraverso la MDTC identificare l'estensione locale o la profondità [129].

La RM combinata con MRCP è la modalità di scelta in aggiunta alla MDTC, identificando il pCCA con sensibilità dell'89% ed accuratezza del 76% [130]. Pertanto per la diagnosi e la stadiazione del pCCA, RM/MRCP, TCMD, ERCP ed EUS vengono frequentemente combinati.

La MDTC_con scansioni sottili è il metodo di prima scelta per la stadiazione del CCA poiché accessibile, in grado di indicare la sede e la dimensione del tumore, l'invasione locale, l'infiltrazione vascolare arteriosa e portale e l'atrofia lobare, le metastasi nei linfonodi regionali e a distanza, consentendo la stadiazione completa della malattia e l'analisi volumetrica del fegato necessaria per la resezione epatica [131].

Il protocollo ottimale prevede uno studio MDTC pre-contrasto, utile per individuare e differenziare un calcolo da un tumore intraduttale [132], seguito da un esame multifasico dopo mdc in fase arteriosa, portale e tardiva (3-30 minuti), associato a ricostruzioni 2D e 3D multiplanari (MPR) e Maximum Intensity Projection (MIP) per lo studio della vascolarizzazione. La scansione tardiva dopo l'iniezione di mezzo di contrasto è in grado di dimostrare l'enhancement tardivo del tumore, espressione dell'abbondante stroma fibroso all'interno dei CCA intraepatici o ilari [132]. Ulteriori ricostruzioni usando algoritmi Minimum-Intensity-Projection (MinIP), ottengono la colangiografia TC (CT-CP), visualizzazione in negativo delle vie biliari, sullo sfondo di un parenchima epatico contrastato. Le immagini MinIP dimostrano la sede e l'estensione tumorale, l'ispessimento di parete e le masse intraduttali con sensibilità, specificità, e accuratezza riportate rispettivamente del 95%, 93.5% e 88.5%, [133-137].

Nella valutazione di resecabilità la TCMD ha accuratezza variabile dal 60 al 91,7%, sensibilità del 56-76% [138,139] e valori predittivi negativi dell'85-100% [140-141].

Il coinvolgimento del legamento epatoduodenale è ben diagnosticato dalla TCMD solo in caso di massiva infiltrazione con evidente infiltrazione vascolare, mentre è difficilmente individuato nei casi di infiltrazioni laminari e ciò riduce sensibilmente l'accuratezza della MDTC nel predire la resecabilità del pCCA.

La sensibilità di TCMD per rilevare metastasi linfonodali varia dal 35 al 63% [141,142], con un'accuratezza variabile dal 63 all'84% a causa dei limiti intrinseci dei criteri dimensionali nel differenziare un linfonodo metastatico piccolo o di un grande linfonodo reattivo [142].

Le immagini TCMD a strato sottile correlano bene (> 90%) con l'estensione locale del tumore rilevata sul campione chirurgico [143], ad eccezione delle metastasi peritoneali che sono generalmente sottostimate [96].

La diffusione peritoneale, se laminare e sottile, è di difficile identificazione alla TCMD in

quanto al di sotto del suo potere di risoluzione e una laparoscopia è consigliabile per identificare metastasi peritoneali occulte, che controindicano l'intervento chirurgico [98].

La MDTC definisce correttamente i sottotipi morfologici di CCA in quasi il 100% dei casi ma ha scarsa accuratezza, inferiore alla MRCP, nel definire l'infiltrazione longitudinale lungo l'albero biliare rispetto alla sua accuratezza nella valutazione dell'infiltrazione assiale agli organi limitrofi [144,145], per sottostima soprattutto dell'estensione prossimale dovuta all'infiltrazione microscopica oltre i margini tumorali. L'infiltrazione longitudinale microscopica è mucosa nelle forme papillari intraduttali e mass-forming, e può estendersi per 10-20 mm, mentre è sottomucosa nell'infiltrativo- periduttale, con estensione media di 6-10 mm [146].

Pertanto, per assicurare margini chirurgici negativi è raccomandabile un margine di resezione di oltre 1 cm nel tipo infiltrativo e di oltre 2 cm nel tipo papillare e mass-forming [147,148].

La RM dinamica con MRCP, associata ad angio-RM, è la metodica ottimale per la diagnosi e la stadiazione del CCA. La MRCP rispetto all'ERCP o alla PTC, ha il vantaggio della non invasività e non necessita di mezzo di contrasto; fornisce inoltre la rappresentazione dell'intero albero biliare, anche dei dotti esclusi [149,150].

Nel valutare l'estensione duttale del tumore, la MRCP ha sensibilità e specificità >90% [133], e un'accuratezza variabile dal 71 al 96% [151,152], leggermente superiore a quella della TCMD che varia dal 60 al 92% [153], in virtù della superiore risoluzione di contrasto.

La MRCP è utile per identificare la porzione ostruita del dotto biliare, per definire l'estensione locale del carcinoma [114]: è in grado di identificare le sedi ostruite con una sensibilità del 94%-99% e nella differenziazione tra stenosi benigna e maligna ha una sensibilità del 70%-96% [155-157].

L'accuratezza della MRCP nel valutare la resecabilità raggiunge il 95%, ed è paragonabile all'ERCP [158].

La combinazione di RM/MRCP e angio-RM dinamica con ricostruzioni 3D vascolari può fornire informazioni utili [144,145], ma con sensibilità - limitata al 67-73% - inferiore all'angio-TCMD e all'angiografia tradizionale, per l'infiltrazione arteriosa, di solito sottostimata [159]; ugualmente la sua accuratezza è scarsa nell'identificazione dell'infiltrazione del legamento epatoduodenale e della diffusione peritoneale [151].

L'accuratezza della RM/MRCP per l'identificazione dell'impegno linfonodale è simile a quella della MDTC [116].

La misurazione del volume di fegato con MDTC e RM è ugualmente efficace con entrambe le metodiche [160].

La RM/MRCP ha una buona accuratezza nella valutazione della resecabilità dei tumori ilari pur con sottostima della diffusione microscopica lungo la mucosa e nello spazio perineurale [154,161-163] comparabile a quella della MDTC con ricostruzioni multiplanari [164]. L'accuratezza di MDTC e RM/ MRCP per la previsione del grado di coinvolgimento duttale, l'invasione arteriosa epatica, l'invasione della vena porta, e le metastasi linfonodali sono rispettivamente nel range dell'84-91%, 83-93%, 86-98% e 74- 84% [165].

Rispetto alla colangiografia diretta, attualmente, è favorita come primo approccio, la combinazione di MRCP e MDTC; tuttavia, un'affidabile differenziazione tra stenosi benigna e maligna non è sempre possibile mediante MRCP. Inoltre, le tecniche di

colangiografia diretta, ERCP o PTC, sono più affidabili della MRCP nel valutare l'estensione longitudinale ed orizzontale del pCCA [166]. Alcuni pazienti poi necessitano di colangiografia diretta, dell'EUS o di Colangioscopia con analisi citologica della bile/biopsia per definire la diagnosi e per risolvere l'ostruzione biliare con posizionamento di stent [167].

Pertanto, più metodiche d'imaging, tra cui MDTC, RM/MRCP e colangiografia diretta, sono di solito utilizzate per la diagnosi di pCCA, per ottenere tutte le informazioni utili a determinarne la resecabilità [168-170].

L'ERCP nei pazienti con sospetta ostruzione biliare maligna e MDTC o RM negative o ambigue oggi ha un ruolo:

- a) per la campionatura dei tessuti dalle lesioni biliari;
- b) quando può modificare la gestione del paziente;
- c) per la colangioscopia;
- d) per la decompressione delle vie biliari mediante stenting [171].

La procedura ERCP comporta una morbidità fino al 10%, più comunemente per pancreatite, e una mortalità dello 0,4%: questi fattori devono essere valutati rispetto ai potenziali benefici dell'ERCP [171-173].

La Colangiografia Percutanea Transepatica (PTC) può aiutare, come seconda scelta dopo l'ERCP, nelle stenosi non accessibili all'ERCP per conferma diagnostica dopo la MRCP per definire con precisione il livello di ostruzione in pazienti con dotti biliari dilatati ed escludere la presenza di calcoli nella via biliare [174].

La scelta tra PTC ed ERCP è generalmente dettata dal livello di esperienza dell'operatore e dalle caratteristiche anatomiche del tumore [175].

L'ERCP viene tradizionalmente preferita a causa del più alto tasso di complicanze maggiori e minori storicamente attribuite alla PTC [176].

Anche se non c'è una chiara evidenza di superiorità della PTC rispetto all'ERCP sulla base del livello di ostruzione, l'approccio percutaneo dovrebbe essere preferibile all'ERCP nelle lesioni biliari prossimali che coinvolgono l'ilo o le vie biliari di primo e secondo ordine, poiché mostra più chiaramente il margine superiore del tumore e la sua estensione nell'albero biliare proximale con accuratezza >90% [177].

Anche la PTC è impiegata per la citologia biliare e per la biopsia/brushing e come primo step per il posizionamento di uno stent [178].

PTC – ERCP e sampling tissutale. La diagnosi tissutale può essere acquisita tramite brushing o biopsia ad ago sottile (FNA), anche EUS-guidata [179-181].

PET-TC: il suo ruolo non è ancora ben definito ed è prematuro stabilirne un uso routinario nel pCCA. La sensibilità nel rilevamento di metastasi a distanza non linfonodali della PET e della PET-TC in pazienti con CCA è tra il 70 ed il 100%, mentre la sensibilità per metastasi linfonodali loco- regionali è risultata solamente del 12% [182]. Un altro studio che comparava MDTC associata a RM versus PET-TC non dimostrava alcun vantaggio per la diagnosi di CCA, ma una migliore accuratezza nella identificazione dei linfonodi regionali e metastasi a distanza [183].

La PET-CT può avere un ruolo potenziale nella stadiazione preoperatoria ma questo deve essere ancora validato [183].

Una laparoscopia di stadiazione ha il ruolo di identificare metastasi epatiche e peritoneali

[184, 185].

Poiché alla presentazione, fino al 50% dei pazienti ha linfonodi positivi e il 10-20% ha un coinvolgimento peritoneale, la maggior parte dei centri utilizza una laparoscopia di stadiazione con o senza esame US laparoscopico per escludere malattia metastatica locale nei pazienti considerati resecabili all'imaging e questa è ancora raccomandata in alcune linee guida prima di tentare una resezione curativa per evitare una laparotomia non necessaria [185]. Tuttavia la laparoscopia di stadiazione con o senza US ha scarsa capacità diagnostica globale, nel range del 25-42% [185-188].

Il recente miglioramento delle metodiche d'imaging non invasivo (PET-CT, EUS e IDUS) ha ridimensionato il suo ruolo. In uno studio di 175 pazienti con pCCA giudicati resecabili dall'imaging e sottoposti a laparoscopia di stadiazione, solo nel 14% la malattia avanzata ha evitato laparotomie non necessarie e nel 32% la non resecabilità fu identificata dalla laparoscopia: tali basse percentuali di accuratezza diagnostica probabilmente dipendono dal miglioramento delle metodiche di imaging nell'ultimo periodo [189].

Ulteriori studi sono necessari per dimostrare i benefici attuali della laparoscopia di stadiazione.

1.5.4.3. Colangiocarcinoma Distale (dCCA)

Il primo e l'unico sistema di classificazione che ha assegnato una definizione per il dCCA separato dal pCCA è la 7^a edizione della classificazione AJCC/UICC (Tabella 3) e ciò è un passo importante, perché sono state dimostrate differenze tra queste due forme extraepatiche di CCA. Ad esempio, la profondità d'invasione duttale e l'invasione del pancreas sono significativamente più comuni nei dCCA [190].

Per il dCCA la profondità di invasione, le metastasi linfonodali, l'invasione perineurale e vascolare microscopica così come l'invasione del pancreas, e la resezione R0 sono risultati fattori predittivi di sopravvivenza [191,192].

La diffusione metastatica linfonodale differisce tra i tre tipi di CCA ed è osservata più comunemente nei dCAA [193].

Diversi studi hanno suggerito che il numero di linfonodi patologici è un fattore prognostico indipendente; più di due linfonodi metastatici sono predittivi di prognosi peggiore. Lo stadio T della classificazione AJCC distingue tumori T1 e T2 sulla base della crescita tumorale microscopica confinato al dotto biliare o oltre il dotto biliare, definizione criticata per la sua vaghezza.

La stadiazione TNM del dCCA condivide alcune delle caratteristiche del pCCA: i tumori T1 e T2 sono confinati alla parete del dotto biliare (T1) o invadono il dotto biliare senza invasione degli organi adiacenti (T2). L'invasione degli organi adiacenti (pancreas, stomaco e duodeno) è considerato T3 per il dCCA. L'invasione del tripode celiaco e dell'arteria mesenterica superiore sono considerati T4. La classificazione TNM del dCCA presenta similitudini con quella del cancro al pancreas. La stadiazione linfonodale del dCCA ha due stadi (N0, N1). Diversamente dai tumori prossimali, la stadiazione linfonodale viene effettuata al momento dell'intervento chirurgico con il campionamento di almeno 12 linfonodi. La TCMD dinamica è essenziale per il primo work-up del dCCA poiché può fornire informazioni riguardanti l'estensione al pancreas, è in grado di rilevare la malattia metastatica e più, nelle immagini in fase arteriosa e portale può rappresentare il

coinvolgimento arterioso e portale [194], ma può sottovalutare l'estensione tumorale che si sviluppa longitudinalmente lungo i dotti e nel peritoneo. Prima dell'intervento chirurgico sono tipicamente richieste immagini aggiuntive mediante la MRCP e l'ERCP. Ognuna di queste consente una visualizzazione accurata dell'albero biliare, ma l'ERCP ha l'ulteriore vantaggio di posizionare un drenaggio biliare pre- operatorio e ottenere la citologia della stenosi, mediante brushing o prelievo, per confermare il dCCA. L'aggiunta di EUS con aspirazione con ago sottile (FNA) può essere considerata se la diagnosi è ancora in discussione e nella valutazione accurata delle metastasi linfonodali e lo stato delle strutture vascolari [195].

1.6. PROGNOSI E TERAPIA

1.6.1. PROGNOSI

La prognosi del CCA è direttamente proporzionale alla sua resecabilità: ad oggi l'unica terapia efficace è la chirurgia, altrimenti la sopravvivenza media è di 6-12 mesi. Nonostante ciò, molto spesso la diagnosi di CCA è tardiva, data la frequente aspecificità dei sintomi, o addirittura accidentale, quando ormai il tumore è ad uno stadio avanzato, talvolta metastatico. Uno dei principali problemi del CCA è infatti la sua precoce capacità metastatica, la cui causa è da ritrovarsi nella caratteristica desmoplastica del CCA stesso. Si definisce desmoplastico un tumore che conta un maggior numero di cellule di origine mesenchimale rispetto alle epiteliali, cosa che favorisce la transizione epitelio-mesenchima e la migrazione delle cellule tumorali, quindi il potenziale metastatico. Nel caso del CCA, questo potenziale si esprime con una precoce diffusione per via linfatica alle stazioni linfonodali regionali e paraortiche e per via ematica a fegato, peritoneo e polmone [196]. Bisogna inoltre sottolineare come il sottotipo mucinoso sia relato a una prognosi più infausta. A differenza della forma mista, che si comporta come una LOS epatica periferica, formante massa e con poca tendenza all'infiltrazione, il CCA mucinoso invece è spesso di piccole dimensioni, infiltrante e con precoce invasività microvascolare e linfatica. Perciò al momento della diagnosi molto spesso il CCA mucinoso è già in uno stadio molto avanzato [197;198].

1.6.2. TERAPIA

Il target principale nella terapia del CCA risulta quindi la sua identificazione e diagnosi precoce, così da permettere una resezione chirurgica, che risulta essere l'unica terapia efficace. La sopravvivenza a 5 anni dopo l'intervento è comunque bassa: 22-44% per l'iCCA, 11-41% per il pCCA and 27-37% per il dCCA. Da considerare inoltre che solo un terzo dei pazienti risulta resecabile all'epoca della diagnosi, mentre tutti gli altri sono indirizzati verso una chemioterapia sistemica a scopo principalmente palliativo.

Il CCA è un tumore altamente eterogeneo in continua trasformazione e si pensa che questa capacità di adattamento e farmacoresistenza sia dovuta all'alto numero di cellule staminali tumorali (CSC), per definizione multipotenti, presenti nel CCA. Un recente studio ha identificato una componente di CSC nel CCA di circa il 30% [3] e si pensa che queste cellule possano ricoprire un ruolo importante sia nello sviluppo della farmacoresistenza, sia nella comparsa di recidive. Nel mondo della ricerca si sta cercando di identificare e successivamente bloccare queste CSC, in modo tale da inibire la crescita tumorale e

ridurre la capacità mutagenica.

In termini di fattori predittivi molecolari della prognosi, un recente studio ha mostrato come l'espressione nucleare di S100A4 nei dotti neoplastici è stata associata con scarsa risposta alla terapia chirurgica nei pazienti affetti CCA.[199]

In termini di marcatori circolanti, ci sono stati alcuni perfezionamenti compreso il ruolo diagnostico di CYFRA 21-1 (un frammento di citocheratina 19), che sembrerebbe poter correlare con le cellule tumorali circolanti nei tratti biliari tumorali.[200]

Studi recenti utilizzando tecnologie più specifiche hanno individuato sequenze di oncogeni nel CCA intraepatico. In particolare, fusioni di geni coinvolgenti FGFR24 sembrerebbero indurre la formazione di tumore in modelli sperimentali di CCA intraepatico, che evidenzia l'inibizione del fattore di crescita del fibroblasto come potenziale nuova strategia terapeutica in questi pazienti. Altri difetti genetici includono mutazioni in IDH e KRAS. Similmente al carcinoma epatocellulare, nella pratica clinica le linee guida per il CCA non includono dati molecolari del tumore nella loro strategia di gestione raccomandata.

Lo studio delle cellule tumorali circolanti (CTC) è emerso come potenziale fonte di nuovi biomarcatori in oncologia.

Alcuni studi hanno valutato il ruolo delle CTC come biomarcatori per prevedere la recidiva, la sopravvivenza o la risposta alla terapia in diversi tipi di tumori; solamente uno studio è stato condotto nel CCA.

1.6.2.1. Chirurgia

1.6.2.1.1. Chirurgia del Colangiocarcinoma intraepatico

La resezione epatica rappresenta l'unica chance di sopravvivenza a distanza per il paziente con colangiocarcinoma intraepatico (ICCA), con percentuali di sopravvivenza a 5 anni dal 23 al 32.9% dopo resezione [201,202]; la sopravvivenza media a 5 anni del 32,9% è stata descritta da Ribero (203) et al in uno studio prospettico multicentrico non controllato del 2012 effettuato su una coorte di 434 pazienti con esclusione di colangiocarcinoma ilare, componente tumorale epatocellulare, presenza di metastasi a distanza; vengono inoltre descritti diversi fattori con valore prognostico preoperatorio; tuttavia circa l'80% dei pazienti non risulta candidabile ad intervento chirurgico per lo stadio avanzato al momento della diagnosi [204].

I criteri generali di non resecabilità includono la presenza di metastasi polmonari, peritoneali e ai linfonodi extra-regionali (para-aortici ed extraperitoneali) [205]

Sul ruolo della laparoscopia esplorativa preoperatoria nei pazienti con ICCA potenzialmente resecabile [206] non vi è consenso poiché al momento non esistono studi randomizzati.

Il ruolo del margine chirurgico nei risultati a distanza rimane controverso. Infatti alcuni lavori dimostrano una migliore prognosi a distanza e una riduzione delle recidive locali nelle resezioni con margine chirurgico negativo per infiltrazione neoplastica (R0) [202,206-209] e altri riportano che il margine chirurgico non rappresenta un fattore prognostico [210-211].

Lo studio multicentrico italiano [202] ha evidenziato un aumento della sopravvivenza nei pazienti R0 e una riduzione della percentuale di recidive; tuttavia l'ampiezza del margine chirurgico non si è dimostrato correlato alla prognosi. Lo studio multicentrico francese

[211] ha evidenziato che il margine chirurgico è un fattore prognostico significativo unicamente nei pazienti senza metastasi linfonodali (N0) e che in questi pazienti il margine > 5 mm risulta un fattore prognostico indipendente di sopravvivenza. Un recente studio multicentrico internazionale [209,212] condotto su 583 pazienti sottoposti a resezione epatica per colangiocarcinoma intraepatico ha evidenziato che il margine chirurgico e l'ampiezza del margine nei pazienti sottoposti a resezione R0 sono un fattore prognostico direttamente correlato alla sopravvivenza globale e libera da recidiva, dimostrando i migliori risultati nei pazienti R0 con margine ≥ 1 cm. In conclusione, il gold-standard della resezione è la rimozione della neoplasia con margine microscopico negativo (R0) Ribero et al. [202] hanno difatti descritto un aumento della sopravvivenza a 1, 3 e 5 anni nei 367 pazienti con margini di resezione R0 in uno studio prospettico multicentrico non controllato; tale coorte è stata seguita con un follow-up medio di 36,5 mesi ed era composta da pazienti con iCCA senza componente epatocellulare.

La linfadenectomia regionale è indicata per una corretta stadiazione del paziente [204].

Questa include i linfonodi ilari, del peduncolo epatico, dell'arteria epatica comune fino al tripode celiaco e retroduodenali superiori.

Nel caso di un colangiocarcinoma intraepatico a sede nell'emifegato sinistro devono essere incluse le stazioni linfonodali della piccola curvatura gastrica [204,212].

Nonostante non siano presenti in letteratura dati sui potenziali effetti sulla prognosi della linfadenectomia, poichè le metastasi linfonodali (N1) sono presenti in più del 30% dei pazienti resecati, la linfadenectomia regionale è fortemente raccomandata nei pazienti sottoposti a resezione epatica per colangiocarcinoma per una corretta stadiazione e una buona valutazione della prognosi. Spolverato et al. in uno studio retrospettivo effettuato su 583 pazienti con iCCA hanno dimostrato che la presenza di coinvolgimento linfonodale determina una diminuzione dell'OS [209,213]. Lo studio retrospettivo di Farges et al. [211] ha dimostrato che lo stadio pTNM è predittivo di diminuito OS e che la resezione R1 è associata ad una significativa diminuzione dell'OS solo nei pazienti con assenza di coinvolgimento linfonodale all'analisi patologica (pN0); si dimostra dunque l'importanza del valore stadiale della linfadenectomia.

Le metastasi linfonodali, le dimensioni ≥ 5 cm, le lesioni multiple, l'infiltrazione del margine chirurgico, l'invasione perineurale e vascolare sono riconosciuti fattori prognostici negativi dopo la resezione [214] ma non sono considerabili fattori che controindicano sempre la resezione. La decisione sulla resecabilità deve essere presa in un contesto multidisciplinare e la gestione dei pazienti affidata a centri specialistici e ad alto volume.

1.6.2.1.2. Chirurgia del Colangiocarcinoma extraepatico

La resezione chirurgica con margini negativi rappresenta l'unico trattamento potenzialmente curativo nei pazienti con neoplasia resecabile. In letteratura sono riportate percentuali di sopravvivenza a 5 anni dal 20 al 42% nei pazienti con colangiocarcinoma dell'ilo e dal 16 al 52% nei pazienti con colangiocarcinoma della via biliare distale [204].

I criteri di non resecabilità generali includono la presenza di metastasi epatiche, polmonari, peritoneali e ai linfonodi extra-regionali (para-aortici ed extraperitoneali) [204]. Il tipo di intervento è correlato alla sede della neoplasia: duodenocefalopancreasectomia (DCP) per tumori del terzo medio e terzo distale della via biliare principale (VBP) e

resezione della convergenza biliare con la VBP associata a resezione epatica maggiore per tumori dell'ilo epatico o peri-ilari (pCCA) [204].

In questi tumori i dotti biliari del caudato convergono nella convergenza biliare principale e risultano spesso infiltrati [3215] e la resezione del lobo caudato è quindi indicata perché aumenta la percentuale di resezioni curative R0 con un miglioramento dei risultati a distanza [216].

In particolare, in uno studio retrospettivo multicentrico di Nuzzo et al. [216] ha dimostrato che la resezione epatica è associata ad un maggiore tasso di resezioni R0 e ha confermato che la resezione R0 è significativamente associata ad un aumento dell'OS mentre la resezione del lobo caudato non lo è.

L'esame istologico estemporaneo dei margini di resezione biliare prossimale e distale in corso di intervento chirurgico è raccomandata per valutare la necessità di estendere la resezione fino a ottenere una resezione R0 [204] se tecnicamente possibile. Nei pazienti con infiltrazione portale la resezione vascolare è utile perché la prognosi dei pazienti resecati è migliore dei pazienti non operati [216-385].

La linfadenectomia regionale fa parte dell'intervento di resezione. Nei tumori dell'ilo devono essere asportati i linfonodi ilari, del peduncolo epatico, dell'arteria epatica comune fino al tripode celiaco e retroduodenali superiori. Nei tumori della via biliare distale devono essere inclusi anche quelli retropancreatici e del fianco destro dell'arteria mesenterica superiore. Non ci sono evidenze sulla utilità di una linfadenectomia estesa, alla quale corrisponde certamente un aumento consistente delle complicanze postoperatorie.

La presenza di metastasi linfonodali è il fattore prognostico peggiore dopo resezione, ma dati recenti dimostrano che la presenza di metastasi in un numero esiguo di linfonodi, non esclude la possibilità di sopravvivenza a lungo termine [217].

La settima edizione del TNM [218] relativa al pCCA definisce T4, generalmente considerato come non resecabile, un tumore che infiltra il tronco portale o le sue diramazioni principali bilateralmente, l'arteria epatica comune, i dotti biliari settoriali bilateralmente, o i dotti biliari settoriali da un lato e i rami portali o arteriosi controlaterali. Tuttavia studi recenti hanno dimostrato un miglioramento della prognosi dei pazienti sottoposti a resezione vascolare portale e quindi sembra necessaria una nuova classificazione per la stadiazione di questi pazienti così da poter formulare criteri di invasione locale condivisi di non resecabilità [219].

1.6.2.2. TERAPIA ADIUVANTE

1.6.2.2.1. Chemioterapia e Chemio-Radioterapia concomitante

I tumori delle vie biliari hanno un tasso di recidiva sia locale che sistemica molto elevato, con una sopravvivenza a lungo termine estremamente modesta (tra il 5% ed il 15%) [220].

Tutto questo rende molto razionale l'utilizzo di trattamenti post-operatori a scopo adiuvante sia chemioterapici che radioterapici. Purtroppo però la strategia di trattamento ottimale non è stata ancora chiaramente definita. Infatti le evidenze scientifiche a supporto delle terapie adiuvanti nei tumori delle vie biliari si basano prevalentemente su studi retrospettivi, non randomizzati, con casistiche limitate ed eterogenee sia per la tipologia di pazienti analizzati, sia per i trattamenti utilizzati. Inoltre, lo standard terapeutico circa la

terapia medica dei tumori delle vie biliari è stato definito solo recentemente [221] e quindi negli studi di terapia adiuvante sono stati utilizzati trattamenti sistemici eterogenei: monoterapia con 5-fluorouracile/capecitabina o con gemcitabina o combinazioni tra questi ultimi e i derivati del platino o altri agenti. Vi sono varie analisi retrospettive che suggeriscono un possibile beneficio dei trattamenti adiuvanti chemio- radioterapici rispetto al solo follow up nei pazienti sottoposti a chirurgia con intento curativo (R0 o R1), ma, come accennato in precedenza, si tratta di casistiche estremamente eterogenee analizzate con scarsa accuratezza metodologica [222-226].

C'è un unico studio randomizzato di fase III, pubblicato da Takada et al. nel 2002 [227]: in cui pazienti sono stati randomizzati a ricevere chemioterapia adiuvante con mitomicina-C al momento della chirurgia e poi 5-fluorouracile (5-FU) per 2 cicli di trattamento per 5 giorni consecutivi durante la prima e la terza settimana post-operatoria, seguito da 5-FU al giorno per via orale o fino recidiva.

L'analisi multivariata dopo aggiustamento per i fattori prognostici indipendenti (età, sede delle vie biliari, grado di differenziazione del tumore e linfonodi positivi), ha evidenziato un vantaggio statisticamente significativo in sopravvivenza per la chemioterapia, in particolare il trattamento con gemcitabina ha dimostrato un profilo di tollerabilità migliore.

I dati più importanti circa il ruolo delle terapie adiuvanti nei carcinomi delle vie biliari vengono dalla meta-analisi pubblicata nel 2012 da Horgan et al, condotta sugli studi pubblicati tra il 1980 ed il 2010 [228].

Nella popolazione complessiva, i dati aggregati mostrano un miglioramento della sopravvivenza con qualsiasi terapia adiuvante rispetto alla sola chirurgia non statisticamente significativo. Non è stato osservato un beneficio significativo anche quando i singoli siti di malattia sono stati analizzati in modo indipendente. Nelle analisi di sensitività l'effetto della terapia adiuvante è risultato dipendente dalla modalità di trattamento, con un beneficio maggiore per i pazienti trattati con la chemioterapia o con la chemio-radioterapia rispetto a quelli trattati con la sola radioterapia. Il test per le differenze di sottogruppo è significativo. Complessivamente questa meta-analisi non evidenzia un beneficio significativo per la terapia adiuvante in pazienti non selezionati. Tuttavia, in sottogruppi di pazienti ad alto rischio, come quelli con i linfonodi positivi o margini di resezione positivi, la terapia adiuvante dopo resezione sembra vantaggiosa. In particolare i dati supportano l'utilizzo della chemioterapia adiuvante nei pazienti N+ e della radioterapia adiuvante nei pazienti R1. E' difficile invece trarre conclusioni definitive circa il ruolo della chemioterapia adiuvante nei pazienti con linfonodi negativi e circa il ruolo della radioterapia adiuvante nei pazienti R0. E' impossibile infine stimare se vi siano differenze tra i diversi tipi di chemioterapia utilizzati vuoi per tipo di farmaco, vuoi per monoterapia verso combinazione. Questa meta-analisi ha vari limiti. In primo luogo, gli studi inclusi hanno avuto un elevato livello di eterogeneità. Tuttavia, tutti questi studi hanno confrontato terapia adiuvante rispetto a nessuna terapia e le tecniche chirurgiche, gli agenti chemioterapici, e i protocolli di radioterapia erano relativamente coerenti in tutti gli studi. Inoltre, erano disponibili solo i dati sui tassi di sopravvivenza, pertanto, non è stato possibile calcolare gli HR e sono stati calcolati invece gli OR. Tuttavia, questo era l'unico metodo realizzabile con i dati disponibili. Oltre a ciò, la meta-analisi

prevalentemente comprende dati retrospettivi e in molti degli studi includevano pazienti sottoposti a resezioni R1. Inoltre, gli studi compresi in questa analisi sono stati condotti da istituzioni con elevati livelli di competenza nel trattamento di questi tumori e con volumi relativamente grandi di pazienti. Nello stesso anno, una simile revisione sistematica è stata condotta da Marta Bonet Beltràn e coll. su lavori pubblicati tra il 1995 e il 2008 in cui fosse stata utilizzata radioterapia 3D. L'hazard ratio complessivo è risultato 0.62 ($p<0.001$). È stato osservato inoltre che complessivamente nel gruppo di pazienti sottoposti a RT, la maggior parte dei pazienti aveva margini positivi. [229]

L'unico studio rilevante pubblicato dopo la meta-analisi è lo studio SWOG S0809, pubblicato nel 2015 da Ben-Josef [230]. Si tratta di uno studio osservazionale di fase II multicentrico americano di terapia adiuvante composta da chemioterapia seguita da chemio-radioterapia in pazienti con carcinoma della colecisti o con colangiocarcinoma extra-epatico. La sopravvivenza a 2 anni è stata del 65%; nei pazienti R0 e R1 è stata rispettivamente del 67% e del 60%. La sopravvivenza mediana globale è stata di 35 mesi. In sintesi, questo è uno studio di fase II che ha raggiunto il suo obiettivo. I risultati dimostrano la fattibilità del trattamento con gemcitabina e capecitabina seguita da chemio-radioterapia con concomitante capecitabina; questo regime adiuvante ha una efficacia promettente.

1.6.2.2.2. Radioterapia esclusiva

Nel trattamento dei tumori delle vie biliari le tecniche convenzionali non consentono di somministrare dosi maggiori di 40-50 Gy. I recenti sviluppi tecnologici con l'introduzione della radioterapia a intensità modulata (IMRT) ha permesso di aumentare la conformazione della dose al target e ridurre quella agli organi a rischio. Lo studio osservazionale prospettico di Fuller et al. pubblicato nel 2009, ha confrontato pazienti trattati con IMRT e con RT conformazionale (231). Si è verificato un aumento della sopravvivenza nel gruppo trattato con IMRT con una OS mediana di 17.6 mesi vs 9.0 mesi [232].

1.6.2.3. TRATTAMENTO DELLA MALATTIA LOCALMENTE AVANZATA

1.6.2.3.1. Radio-Chemioterapia

Nel 2014, Woo Yi et al. [233] hanno analizzato retrospettivamente 176 pazienti con colangiocarcinoma inoperabile sottoposti a RTCT o a best supportive care. La RT è stata somministrata alla dose mediana di 56 Gy su T e linfonodi di drenaggio quando indicato, con boost sul T per raggiungere una dose mediana di 50 Gy. La chemioterapia concomitante è stata a base di 5FU nel 72.6% dei casi e di gemcitabina nel 27.4%. Complessivamente nessuna risposta completa al trattamento è stata osservata, e il tasso di risposte parziali è stato del 19.8%, con stabilizzazione di malattia nel 69.8% dei pazienti. Nel gruppo di pazienti con tumore delle vie biliari extraepatiche la sopravvivenza globale mediana è stata di 81.57 settimane per quelli sottoposti RTCT e 17.86 settimane per coloro che avevano ricevuto BSC. All'analisi multivariata, effettuata con regressione di Cox, la RTCT è risultata l'unico fattore correlato alla sopravvivenza, rispetto a età, sesso, stadio e ECOG-PS.

1.6.2.3.2. Termoablazione

Nell'iCCA sono stati condotti pochi studi sull'ablazione, con outcomes meno ottimali rispetto a quelli osservati nell'HCC. La RFA può fornire un controllo locale di lesioni di piccole dimensioni, localizzate, non resecabili, senza diffusione extra-epatica [234,235]. Infatti nello studio retrospettivo di Kim et al [235] condotto su 15 pazienti è stato dimostrato che nei tumori di piccole dimensioni si riscontrano percentuali di efficacia tecnica primaria e di necrosi del 90-100%. Inoltre, la sopravvivenza mediana globale varia tra i 33 e i 38.5 mesi, la sopravvivenza ad un anno tra l'84.6% ed il 100%, e la sopravvivenza a 3 anni tra il 43.3% ed il 83.3%. Questi risultati suggeriscono che nei pazienti con iCCA singolo di piccole dimensioni la RFA può avere benefici sulla sopravvivenza rispetto ad altri trattamenti palliativi. Nei pazienti con recidive locali o malattia residua dopo resezione con intento curativo, la RFA ha determinato una sopravvivenza mediana da 27.4 fino a 51 mesi [235]. I limiti della RFA sono una scarsa efficacia nelle lesioni di dimensioni superiori a 5 cm e complicanze tecniche in prossimità dei grossi vasi e della capsula [235, 236]. La quota di recidive dopo RF è abbastanza alta [236].

1.6.2.3.3. Chemioembolizzazione arteriosa (TACE)

In letteratura vi è un limitato numero di studi sulla TACE in pazienti affetti da iCCA e non ci sono trials che abbiano valutato sistematicamente i risultati della TACE nel trattamento di tali pazienti. La maggior parte degli studi sulla TACE sono retrospettivi e non utilizzano uno stesso chemioterapico o una pianificazione di trattamento standardizzata. I pochi studi sulla TACE nell'iCCA non resecabile hanno dimostrato modesti miglioramenti della sopravvivenza [237-240].

Una recente meta-analisi di 14 trials di trattamenti intrarteriosi in pazienti con iCCA non resecabile ha dimostrato una sopravvivenza mediana di 15.6 ± 1.1 mesi; il 49.8% della totalità dei pazienti hanno mostrato malattia stabile secondo i criteri RECIST [238-240].

La sopravvivenza della cTACE può essere incrementata da chemioterapia sistemica sequenziale [240].

1.6.2.3.4. La radioembolizzazione arteriosa (TARE)

La radioembolizzazione arteriosa (TARE) consiste nell'infusione intra-arteriosa di sostanze radioattive, come lo iodio-131 (^{131}I) associato a lipiodol, o microsfele contenenti Ittrio-90 (^{90}Y) attraverso l'arteria epatica [241].

Queste sostanze radioattive iniettate per via arteriosa vengono rilasciate in prossimità della lesione, ove emettono radiazioni a bassa penetranza ed alta energia (β particelle). La TARE con ^{90}Y è stata usata nel trattamento dell'HCC, nelle metastasi epatiche da tumore coloretale o da tumore neuroendocrino: in questi ambiti la TARE si è dimostrata un trattamento sicuro ed efficace [242-244].

Numerosi trials clinici in pazienti con iCCA non resecabile trattati con TARE sono in corso, in attesa dei risultati definitivi. In particolare, nello studio retrospettivo di Hoffman et al. 33 pazienti con iCCA non resecabile dopo TARE hanno dimostrato la sicurezza ed efficacia del trattamento nell'iCCA, con tassi di controllo di malattia tra il 72% ed il 95%, con sopravvivenza mediana globale tra 9.3 e 22 mesi [245-247], nonostante l'esiguità dei casi presi in esame. In un altro studio [248] la sopravvivenza ad 1 anno dopo TARE era del

56%. I fattori prognostici favorevoli sono l'Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status, l'entità della massa neoplastica (tumor burden), il tipo di tumore, l'invasione portale e la risposta tumorale. La TARE si è dimostrata una procedura relativamente sicura, con effetti collaterali minori, maggiormente rappresentati da astenia, dolore addominale e transitorio incremento della bilirubinemia sierica. E' da considerare come valida alternativa nell'iCCA non resecabile in assenza di diffusione extraepatica.

1.6.2.3.5. **Brachiterapia**

La Brachiterapia percutanea intraluminale (ILBT) associata alla radioterapia a fasci esterni (ERBT) in studi retrospettivi si è dimostrata efficace per la palliazione dei pCCA non resecabili, eseguita per via endoscopica o per via percutanea [249, 250].

Esperienze recenti [251-257] su ILBT e ERBT combinate hanno dimostrato un miglioramento della sopravvivenza, rispetto alle singole procedure palliative. L'aggiunta di ERBT all'ILBT sembra raddoppiare la sopravvivenza rispetto al trattamento con il solo ILBT (14 vs 7 mesi) [258].

Inoltre lo studio retrospettivo di Takamuda et al., ha confermato che la combinazione di ILBT e ERBT dopo stenting prolunga la sopravvivenza nei pazienti con CCA (387,9 giorni) rispetto ai pazienti trattati con sola palliazione mediante stenting (298 giorni: $p < 0.05$). Pertanto, nel pCCA non resecabile, la radioterapia ottenuta combinando ILBT e ERBT, seguita da posizionamento percutaneo di stent metallico rappresenta il trattamento di prima scelta, può migliorare la sopravvivenza con bassa morbidità.

1.6.2.4. **TERAPIA DELLA MALATTIA SISTEMICA**

La maggior parte dei pazienti con tumore delle vie biliari si presenta alla diagnosi con malattia localmente avanzata o metastatica e, anche dopo un intervento chirurgico radicale e potenzialmente curativo, la recidiva si manifesta in circa il 60% dei casi, prevalentemente nei primi due anni dal trattamento resettivo. Nei pazienti metastatici il trattamento di riferimento è rappresentato dalla chemioterapia sistemica il cui obiettivo primario è prolungare la sopravvivenza dei pazienti nonché migliorarne la qualità di vita. Il beneficio della chemioterapia sistemica rispetto alla sola terapia di supporto in pazienti con neoplasie bilio-pancreatiche non resecabili è stato dimostrato inizialmente in un trial randomizzato che ha mostrato un vantaggio statisticamente significativo a favore della chemioterapia in termini di sopravvivenza e di qualità di vita [259].

Più recentemente uno studio randomizzato condotto su pazienti con neoplasia della colecisti in stadio avanzato ha confermato definitivamente la superiorità della chemioterapia sulla sola best supportive care [260].

Bisogna tuttavia sottolineare come i due studi siano stati condotti su casistiche limitate e costituite nel primo caso da una popolazione eterogenea composta sia da neoplasie delle vie biliari che da adenocarcinomi pancreatici e, nel secondo caso, unicamente da pazienti con neoplasia della colecisti, biologicamente e prognosticamente affine ma non sovrapponibile al colangiocarcinoma. [261-268].

La gemcitabina è l'agente chemioterapico maggiormente impiegato nella terapia sistemica dei tumori delle vie biliari. La gemcitabina in monoterapia nelle neoplasie biliari avanzate ottiene tassi di risposta oscillanti dal 9.4% al 36% con una sopravvivenza mediana

raramente superiore ad 8 mesi [269-277].

I regimi di combinazione con due farmaci hanno dimostrato una significativa superiorità in termini di efficacia rispetto alla sola monochemioterapia e, da un'analisi per sottogruppi, fra i vari agenti chemioterapici, la combinazione della gemcitabina con i derivati del platino ha dimostrato la maggiore efficacia nel trattamento delle neoplasie biliari avanzate.

Negli ultimi anni, diversi studi hanno valutato l'efficacia e la tollerabilità dei due regimi di combinazione a base di gemcitabina, gemcitabina-oxaliplatino (GEMOX) e gemcitabina-cisplatino (GEMCIS), anche se nessuno studio randomizzato comparativo è stato finora condotto con l'obiettivo di dimostrare la superiorità di un regime di associazione sull'altro. La superiorità di CISGEM sulla gemcitabina da sola è stata dimostrata da Valle et al. in uno studio di fase II, esteso *in itinere* in uno studio di fase III, consistente in un trial clinico randomizzato multicentrico su 410 pazienti con diagnosi patologica di tumore delle vie biliari (iCCA, pCCA, eCCA, CC o dell'ampolla di Vater); le sopravvivenze medie dei pazienti che hanno ricevuto CISGEM e quelli che hanno ricevuto gemcitabina da sola sono state 11,7 mesi e 8,1 mesi rispettivamente [221].

Gli studi di fase II che hanno utilizzato la combinazione di gemcitabina-cisplatino hanno ottenuto complessivamente una progression-free survival (PFS) mediana e una overall-survival (OS) mediana variabili rispettivamente da 3 a 8 mesi e da 6.8 a 11.7 mesi [278-280]. Gli studi di fase II di combinazione di gemcitabina ed oxaliplatino nel trattamento di prima linea dei tumori delle vie biliari in stadio avanzato hanno mostrato un tasso di risposta globale variabile dal 15% al 50% e una OS mediana variabile dagli 8.3 ai 12.4 mesi [281-289].

Recentemente sono stati pubblicati due trial randomizzati di potenza adeguata che hanno confrontato la monoterapia con gemcitabina con l'associazione di gemcitabina e cisplatino nel trattamento di prima linea dei pazienti con tumori delle vie biliari in stadio avanzato. Un trial preliminare di fase II (ABC-01) condotto su 86 pazienti ha dimostrato un miglioramento della PFS (progression-free survival) a 6 mesi con la combinazione di gemcitabina e cisplatino rispetto alla terapia con sola gemcitabina [279].

Lo studio è stato poi esteso alla fase III (ABC-02) con il reclutamento pianificato di 410 pazienti da 37 centri del Regno Unito e l'introduzione della OS come end-point primario [224].

Il controllo della neoplasia, identificabile nella risposta parziale o completa o nella stabilità di malattia, è stato ottenuto nell'81.4% dei pazienti trattati con il regime combinato e nel 71.8% dei pazienti in monoterapia con gemcitabina. La sopravvivenza mediana nel gruppo cisplatino-gemcitabina è stata di 11.7 mesi, significativamente maggiore ($p<0.001$) rispetto agli 8.1 mesi del gruppo trattato con sola gemcitabina; l'associazione dei due agenti ha anche dimostrato un significativo miglioramento della PFS mediana rispetto alla monoterapia con gemcitabina (8 mesi vs 5 mesi, $p<0.001$) [221].

Uno studio multicentrico condotto in Giappone su 84 pazienti totali randomizzati ad una chemioterapia di combinazione con schedula gemcitabina-cisplatino ($n=42$), identica a quella dello studio ABC-02, o alla monoterapia con gemcitabina ($n=42$), ha ottenuto risultati simili a quelli del trial ABC-02, riportando, con lo schema gemcitabina-cisplatino, una superiorità in termini di ORR (19.5% vs. 11.9%), DCR (68.3% vs. 50%), PFS mediana

(5.8 vs. 3.7 mesi) e OS mediana (11.2 vs. 7.7 mesi), rispetto alla monochemioterapia con gemcitabina [275].

Recentemente una meta-analisi che ha incluso i due studi di cui sopra ha dimostrato come i risultati ottenuti siano consistenti fra loro, rafforzando il concetto dell'uso combinato di cisplatino e gemcitabina. [290].

Mancando tuttavia al momento uno studio randomizzato di confronto diretto tra i due regimi di combinazione gemcitabina- oxaliplatino (GEMOX) e gemcitabina-cisplatino (GEMCIS) nel trattamento di prima linea dei tumori delle vie biliari in stadio avanzato, non è possibile definire la superiorità di un regime chemioterapico sull'altro e l'uso alternativo dell'oxaliplatino può essere preso in considerazione almeno in alcuni sottogruppi di pazienti a maggior rischio di effetti secondari legati all'impiego del cisplatino. Il termine tumore delle vie biliari localmente avanzato o metastatico comprende un'ampia ed eterogenea categoria di pazienti e malattie correlate, con differenti caratteristiche cliniche e biologiche che influenzano il risultato di una chemioterapia di prima linea. Una valutazione dei fattori prognostici nei pazienti con tumori delle vie biliari in stadio avanzato sottoposti a chemioterapia di prima linea può meglio selezionare sottogruppi specifici che maggiormente beneficiano di terapie sistemiche. Da un'analisi multivariata condotta nel 2009 su un totale di 213 pazienti trattati con differenti regimi chemioterapici nell'ambito di diversi trial di fase II e serie retrospettive, il performance status è risultato un fattore prognostico indipendente per la sopravvivenza dei pazienti con tumori delle vie biliari in stadio avanzato sottoposti a chemioterapia [291].

La recente meta-analisi che ha analizzato i dati combinati del trial inglese ABC-02 e del trial giapponese BT22 ha dimostrato che sono i pazienti con buon performance status (0-1) che traggono il maggior beneficio dalla chemioterapia di combinazione. Pazienti con PS di 2 sono stati inclusi solo nello studio ABC-02 e l'HR per l'OS in questo gruppo è stato pari a 0.88 [290].

Pertanto, in assenza di studi condotti elettivamente su pazienti con scarso performance status, in questo sottogruppo è, al momento, preferibile considerare la monoterapia con gemcitabina come prima scelta di terapia sistemica.

Limitati in ampiezza, i pochi trial a disposizione hanno fornito risultati interlocutori relativamente all'impiego delle terapie a bersaglio molecolare nel trattamento dei pazienti con tumori delle vie biliari in stadio avanzato, nonostante dati preclinici suggeriscano un potenziale ruolo terapeutico di agenti diretti contro specifici bersagli molecolari, come l'EGFR, coinvolti nella patogenesi del colangiocarcinoma. Uno primo studio di fase II non controllato ha suggerito efficacia di una combinazione di GEMOX e cetuximab, con tasso di risposta obiettiva del 63%, e un buon numero di pazienti sottoposti a resezione potenzialmente curativa dopo la risposta ottenuta con la terapia sistemica [292].

Tuttavia in uno studio randomizzato di fase II recentemente pubblicato (BINGO trial), l'aggiunta del cetuximab alla chemioterapia con gemcitabina ed oxaliplatino (GEMOX) non ha determinato alcuna differenza statisticamente significativa rispetto alla sola chemioterapia, sia in termini di risposta al trattamento sia in termini di sopravvivenza, eccetto un leggero trend in PFS a favore del gruppo trattato con cetuximab [293].

Un altro recente trial randomizzato di fase III ha confrontato l'efficacia di due schemi terapeutici: un trattamento chemioterapico con gemcitabina ed oxaliplatino da un lato e

l'associazione degli stessi farmaci con erlotinib dall'altro. La risposta obiettiva è risultata significativamente più alta nei pazienti trattati con chemioterapia in associazione ad erlotinib, anche se la sopravvivenza è risultata simile nei due gruppi [294].

Uno studio di fase II non controllato ha dimostrato una discreta efficacia ed un accettabile profilo di tossicità di una terapia di combinazione con GEMOX e bevacizumab, seppure, data la mancanza di studi randomizzati controllati, non è possibile al momento stabilire il reale beneficio derivante dell'aggiunta del bevacizumab alla chemioterapia [295].

Infine, un recente studio randomizzato multicentrico di fase II ha confrontato l'efficacia del vantetanib (inibitore tirosin-chinasico multitarget diretto contro VEGFR-2, EGFR/HER1 e RET-chinasi) in monoterapia con l'associazione dello stesso alla gemcitabina e con la combinazione gemcitabina-placebo, nel trattamento delle neoplasie delle vie biliari in stadio avanzato. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata registrata nei tre bracci di trattamento in termini di PFS, endpoint primario dello studio [296].

Data la rarità della malattia, l'outcome sfavorevole e lo scarso performance status dei pazienti al momento della progressione dopo una prima linea di chemioterapia, sono stati finora condotti pochi studi riguardanti una seconda od ulteriori linee di chemioterapia. Dai dati a disposizione, non è chiaro quale sia il beneficio della chemioterapia né tantomeno il regime più appropriato in questo setting. Nel 2014 sono stati pubblicati i risultati di una revisione sistematica dei dati di letteratura relativi al ruolo della chemioterapia di II linea nei pazienti con tumori delle vie biliari in stadio avanzato, comprendente trials di fase II, studi retrospettivi e case-reports. La media ponderata dell'OS calcolata sui 12 trials di fase II analizzati è stata di 6.6 mesi mentre la PFS di 2.8 mesi. Dai dati complessivi, considerando la mancanza di trials randomizzati e la grande quantità di studi retrospettivi, è emerso un basso livello di evidenza a supporto dell'impiego di un trattamento chemioterapico di II linea nei pazienti con tumori delle vie biliari in stadio avanzato [297]. Gli studi di fase II che hanno valutato agenti fluoropirimidinici, da soli o in associazione ad altri chemioterapici, come terapia di II linea nei pazienti con tumori delle vie biliari in progressione dopo una I linea a base di gemcitabina, hanno ottenuto risultati modesti con tassi complessivi di risposta variabili. Inoltre, l'aggiunta di un secondo chemioterapico ad una fluoropirimidina non fornisce un significativo vantaggio in termini di sopravvivenza probabilmente anche a causa dell'aumento di tossicità dovuto ad una terapia di combinazione in pazienti con scarso performance status [298-302].

Una recente analisi retrospettiva italiana di Fornaro et al. [303] effettuata su 357 pazienti trattati con seconda linea, stratificando pazienti con tumori delle vie biliari in progressione dopo una I linea di chemioterapia sulla base di quattro parametri clinici e di laboratorio (come l'ECOG performance status, il valore basale di CA19.9, la chirurgia sul tumore primitivo e la PFS dopo chemioterapia di I linea), ha identificato tre sottogruppi a prognosi differente: gruppo a prognosi favorevole (pazienti con al massimo un fattore prognostico negativo); gruppo a prognosi intermedia, gruppo a prognosi sfavorevole le cui sopravvivenze medie sono state rispettivamente 13,1, 6,6 e 3,7 mesi. Da un'analisi multivariata, il buon performance status risulta essere il più importante fattore prognostico associato alla sopravvivenza dei pazienti sottoposti ad un trattamento chemioterapico di II linea e, pertanto, rappresenta un importante criterio di selezione per

identificare categorie di pazienti che possono beneficiare maggiormente di un trattamento chemioterapico al momento della progressione dopo una prima linea di terapia [303].

Al momento mancano studi randomizzati che dimostrino il reale beneficio di un trattamento chemioterapico di II linea in pazienti con tumori delle vie biliari in stadio avanzato in progressione dopo una I linea di terapia e non è definito il tipo di schema terapeutico più appropriato in questo setting.

2. TEORIA DELLE CANCER STEM CELL

2.1. CELLULE STAMINALI E CELLULE STAMINALI TUMORALI

Già da tempo è noto che ogni tessuto dell'organismo è costituito, seppur in minima parte, da un compartimento di cellule staminali, responsabili del controllo omeostatico dei tessuti per tutta la durata della vita. Le cellule staminali sono caratterizzate da tre proprietà:

- Clonogenicità: capacità di una cellula di generare una colonia clonale, cioè geneticamente identica alla cellula di partenza,

- Autorinnovamento: capacità di una cellula di dare origine a due cellule figlie di pari potenza della madre,

- Divisione asimmetrica: capacità di una cellula di dare origine a due cellule figlie, una staminale e una *committed*.

Le cellule staminali adulte (o *staminali somatiche*) possiedono un potenziale differenziativo ridotto rispetto alle embrionali e sono state primariamente individuate nei tessuti ad alto *turn-over* cellulare, come la cute, l'epitelio gastroenterico e il tessuto emopoietico. Nella maggior parte dei casi le staminali somatiche sono localizzate in speciali microambienti detti nicchie staminali, formate da cellule in grado di generare e trasmettere segnali che regolano l'automantenimento e il differenziamento delle cellule staminali [304]. Tuttavia, le cellule che hanno il maggior ruolo nella replicazione non sono staminali, ma sono cellule direttamente derivate dal esse, che prendono il nome di progenitori o compartimento trans-amplificante (*transit amplifying cells –TAC*), senza capacità di autorinnovamento. In questo modo viene preservata l'integrità del genoma delle cellule staminali, poiché un basso indice mitotico riduce il rischio di mutazioni. Difatti una mutazione a carico della cellula staminale viene trasmessa a tutte le generazioni figlie, mentre una mutazione nel progenitore riguarderà una sola generazione. In seguito alla scoperta delle staminali adulte, si è ipotizzato che possano esistere anche delle cellule staminali tumorali (*cancer stem cells CSC*). Si è perciò recentemente affiancata alla più antica teoria "stocastica" della cancerogenesi, secondo la quale qualsiasi cellula, a qualsiasi stadio differenziativo, può essere bersaglio del processo di cancerogenesi, una nuova teoria della "staminale" o "gerarchica". Questa teoria afferma che solo alcune cellule, che siano staminali o *committed* lungo il *lineage* differenziativo, sono bersaglio di mutazioni tali da far assumere capacità di proliferazione illimitata e di autorinnovamento. La cellula mutata assume le caratteristiche di staminalità ed esprime marcatori di caratteristici, sfugge ai controlli fisiologici, ai segnali apoptotici e ha una resistenza intrinseca ai chemioterapici, a causa del ridotto tasso di divisione cellulare e dell'espressione di fattori come la MDR1 (*Multiple Drug Resistance-1*), una glicoproteina-p con funzione di pompa che estrinseca i farmaci dalla cellula [305]. Il tessuto neoplastico sarebbe pertanto

caratterizzato da una gerarchia cellulare in cui una popolazione di cellule staminali si autorigenera e dà origine ad una progenie di cellule tumorali, fenotipicamente diverse, che costituiscono la maggior parte della massa neoplastica [306] (Fig. 3).

2.2. CELLULE STAMINALI NEL FEGATO

Lo studio delle cellule staminali ha condotto a risultati interessanti anche la ricerca in campo epatologico. Difatti studi recenti di Cardinale *et al.* [307] hanno evidenziato la presenza di due differenti nicchie contenenti cellule staminali nell'albero biliare. La prima nicchia contiene i progenitori epatici umani (*human Haepatic Progenitor Cells*-hHPCs), precursori pluripotentii degli epatoblasti, localizzata nei canali di Hering in prossimità dello spazio portale (Fig. 4). La seconda nicchia, che contiene le cellule staminali umane dell'albero biliare (*human Biliar Tree Stem Cells*-hBTSCs), è localizzata nel fondo delle ghiandole peribiliari (*Peribiliar Glands*-PBGs) (Fig. 5), ghiandole tubulo-acinose mucino-secermenti localizzate nella parete dei dotti biliari intraepatici di calibro maggiore ed in quelli extraepatici, e sono maggiormente presenti nei punti di biforcazione (dotto cistico, regione perilare e regione periampollare) (Fig. 1). Le cellule ivi contenute sono capaci di dare origine ad epatociti, colangiociti e cellule delle isole pancreatiche. Si ipotizza che il CCA possa derivare da entrambe queste nicchie staminali: la forma mista intraepatica, non mucino-secernte originerebbe dalle hHPCs, mentre la forma mucino-secernte, che sia iCCA, dCCA o pCCA deriverebbe dalle hBTSCs nelle PBGs. Tale ipotesi è sostenuta anche dal fatto che la localizzazione in cui più frequentemente si sviluppano i CCA mucinosi è sovrapponibile alle sedi di maggiore densità di PBGs.

2.3. CSC DEL COLANGIOCARCINOMA

Recenti studi di caratterizzazione istologica e molecolare del CCA hanno sottolineato l'eterogeneità di questo tumore tanto inter-tumorale (tra due CCA diversi) quanto intra-tumorale (cellule dello stesso CCA esprimono fenotipi differenti) [308]. In uno studio di Carpino *et al.* del 2011 [309] viene sostenuto il modello staminale alla base del processo di cancerogenesi del CCA e sono identificate due popolazioni cellulari diverse: la cellula d'origine (o *cancer initiating cell*), ovvero la cellula che acquisisce la prima mutazione che dà il via al processo di cancerogenesi (l'hHPC e l'hBTSC) e le CSC, le cellule che mantengono la crescita e la propagazione tumorale. Il fenotipo delle CSC e delle cellule d'origine si presume sia sostanzialmente diverso. Sebbene questi termini siano spesso usati indifferentemente, essi rappresentano concetti diversi poiché si riferiscono rispettivamente alla cellula che dà inizio al tumore e alle cellule che lo propagano [310,311]. A sostegno di questa ipotesi sono stati individuati numerosi marcatori di staminalità all'interno del CCA, la cui entità di espressione correla con una peggiore prognosi. Sebbene nella maggior parte dei tumori solidi le CSC rappresentano circa il 3% della massa tumorale, nel CCA è stato osservato che >30% esprimono marcatori di staminalità, cosa che permette di focalizzare ancora di più l'attenzione sul ruolo delle CCA-CSC. Inoltre, tutti i marcatori proposti per le CSC sono espressi dalle cellule staminali normali site nei canali di Hering o nelle PBG, andando a individuare in queste strutture la sede di origine della maggior parte dei CCA. D'altra parte, l'assenza di

marcatori specifici limita la possibilità di sviluppare strategie che abbiano come bersaglio le CCA-CSC [3].

Tra i marcatori espressi dalle cellule di CCA, che maggiormente sono stati oggetto di ricerca, troviamo EpCAM, CD90, CD13, CD133, LGR5, ma sono stati osservati e studiati ulteriori marcatori, ad esempio CD44, SOX2, OCT4 e Nanog. È stato osservato come sia simile il profilo dei pCCA e degli iCCA mucino-secernti, con alta espressione di LGR5, mentre le CSC della forma mista di iCCA esprimono alti valori di CD13 [3].

Più nel dettaglio, i marcatori di staminalità su cui maggiormente si è focalizzata l'attenzione per questo studio sono:

● Cluster di differenziazione 90 (*Cluster of Differentiation 90- CD90*) è una proteina glicosilata, ancorata alla superficie cellulare tramite il glicofosfatidilinositolo (GPI). Viene anche chiamata *Thy-1* perché originariamente è stata scoperta sui timociti. È la più piccola molecola della superfamiglia delle immunoglobuline e può essere usata come marcatore di alcune cellule staminali e per i processi assonali dei neuroni maturi. CD90 è espresso negli adulti dai timociti, dalle cellule staminali mesenchimali, cheratinocitiche e ematopoietiche, ma anche dalle cellule endoteliali attivate, dai neuroni e dai fibroblasti e svolge un ruolo sia nella crescita delle staminali, sia nell'infiammazione, promuovendo il rilascio di citochine infiammatorie [312]. Molecola di adesione delle cellule epiteliali (*Epithelial Cell Adhesion Molecule-EpCAM*) è una glicoproteina transmembrana che svolge un ruolo essenziale nella adesione cellulare ed è espressa da tutte le cellule epiteliali dell'organismo. Il dominio intracellulare della proteina, una volta attivato, svolge un ruolo di trasduzione del segnale e trasporto di informazioni circa la proliferazione, la differenziazione e la migrazione cellulare. EpCAM è largamente espresso anche dai carcinomi, mentre ne sono privi i tumori non epiteliali e la sua espressione diminuisce nei carcinomi indifferenziati. Recentemente è stata osservata una co-espressione di CD90 e EpCAM nell'HCC, che potrebbe portare all'individuazione delle CSC in tale neoplasia [313]. Cluster di differenziazione 13 (*Cluster of Differentiation 13- CD13*) è un enzima legato alla membrana cellulare, con attività di metalloproteasi. Viene espresso in gran parte delle cellule di origine mieloide, ma anche nelle leucemie mieloidi e durante le crisi blastiche. È stata individuata anche sulle cellule endoteliali, sui fibroblasti, sull'epitelio del tubulo prossimale renale e sull'epitelio dei canalicoli biliari. CD13 svolge un ruolo importante nel metabolismo enzimatico di molti peptidi biologicamente attivi, nella fagocitosi e nell'attività tumoricida/battericida [314]. Cluster di differenziazione 133 (*Cluster of Differentiation 133-CD133*) è una glicoproteina transmembrana codificata dal gene PROM-1, anche nota come *prominina-1*. La sua funzione non è chiara, si ipotizza possa avere un ruolo nell'organizzazione della membrana cellulare. È espresso dalle cellule staminali ematopoietiche, dai progenitori endoteliali, dalle cellule staminali gliali e neuronali, come anche dalla ghiandola mammaria, dalla trachea, dalle ghiandole salivari, dal rene adulto e dal tubo digerente. È stato identificato anche in numerosi tumori cerebrali pediatrici e nel glioblastoma, tanto che si è pensato che la popolazione CD133+ potesse identificarsi nelle CSC. Ad oggi questa ipotesi è stata relativamente abbandonata, tanto che la ricerca di CD133 è sempre associata ad un altro marcatore di staminalità [315]. Recettore 5 ricco in leucina associato a proteina G (*Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 LGR5*) è una proteina della via di segnalazione *Wnt* ed è espressa da diversi tessuti tra cui

il muscolo, la placenta e il sistema nervoso centrale. È espresso anche su cellule multipotenti gastriche, intestinali e renali, motivo per il quale viene considerato un *marker* di staminalità. Nella cancerogenesi LGR5 risulta un oncosoppressore: la sua inattivazione comporta la perdita di controllo sulla via *Wnt* e promuove la proliferazione [316]. Per quanto numerosi siano i marcatori di staminalità individuati, risulta evidente quanto ancora labili siano i risultati che porteranno all'individuazione certa delle CCA-CSC e, successivamente, alla formulazione di una terapia mirata e efficace. Per questa ragione si stanno studiando nuove molecole che permettano, da sole o in co-espressione con altri marcatori staminali, di individuare le CSC e di migliorare la prognosi del CCA.

3. TEORIA DELLE CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI (CTC)

Le metastasi sono la prima causa di morte nei pazienti oncologici. Lo scopo delle nuove terapie antitumorali è bloccare l'invasione tumorale e prevenire le metastasi, ma per raggiungere questo obiettivo è fondamentale comprendere il meccanismo attraverso il quale le cellule tumorali escono dalla loro localizzazione primaria, entrano nella circolazione sanguigna e si stabiliscono come lesioni a distanza in organi come polmoni, fegato, cervello e midollo osseo.

Le cellule tumorali identificate in transito nella circolazione sanguigna sono definite Cellule Tumorali Circolanti (Circulating Tumor Cells, CTC). Sebbene la loro natura non sia ben conosciuta, si ritiene che una frazione di queste cellule corrisponda a cellule tumorali in grado di iniziare una lesione clonale metastatica. Il processo metastatico richiede la migrazione di cellule maligne da siti primari a sedi distanti rispetto al luogo d'insorgenza del tumore. Anche per i tumori che inizialmente diffondono attraverso i vasi linfatici, la via più comune utilizzata dalle cellule tumorali per metastatizzare rimane sempre la via ematica. Il distacco delle cellule tumorali da un tumore primario nel compartimento ematico prende il nome di transizione epitelio-mesenchimale (EMT). Quando queste cellule tumorali si staccano dal tumore primario, vengono veicolate dal sangue, vi continuano a circolare, e prendono il nome di CTC. Si ipotizza anche che le CTC facciano parte della stessa popolazione alla quale appartengono le cellule staminali tumorali (CSC). Durante la EMT, quindi, le cellule tumorali subiscono peculiari cambiamenti: aumento dell'invasività, maggior capacità di potenziare l'angiogenesi, maggiore resistenza ai segnali apoptotici. Vari tipi di tumori derivano da tessuti epiteliali formati da cellule che sono fortemente polarizzate e connesse da aderenze cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare. Queste adesioni comprendono: le giunzioni aderenti, le tight junctions e le gap junctions. Nelle giunzioni tra cellule sono coinvolte le caderine, mentre le integrine partecipano ai "collegamenti" tra cellula e matrice extracellulare. Queste strutture interagiscono con il citoscheletro delle cellule epiteliali, formando filamenti di actina e di citocheratina. A seguito di queste interazioni, si viene a formare una solida struttura che impedisce il movimento delle cellule epiteliali. Queste ultime acquisiscono una maggiore motilità e invasività quando sopraggiungono cambiamenti di resistenza nei contatti intercellulari e nella ricostruzione dei filamenti del citoscheletro. La produzione di enzimi che degradano la matrice extracellulare permette infine alla cellula tumorale di migrare. Durante la EMT, interviene la down-regulation di tutte quelle proteine (caderine, vimentina, occludina, citocheratine) che sono responsabili dei contatti intercellulari. Ad

esempio, la perdita della E-caderina è necessaria alla cellula tumorale per metastatizzare in altre sedi. L'espressione di alcuni fattori che favoriscono la EMT (come Twist, Slug, Snail, ecc...) protegge poi le CTC dall'apoptosi. La popolazione di CTC è altamente resistente e capace di colonizzare microambienti differenti da quello d'origine. La presenza di CTC nel sangue sembra essere, quindi, un fattore determinante per la metastatizzazione. Dunque la rilevazione, la quantizzazione e la caratterizzazione molecolare delle CTC nel compartimento sanguigno può avere un significato importante in oncologia. Il dosaggio delle CTC può essere utilizzato ad uno stadio iniziale di malattia per predire il rischio di generare metastasi e per valutare la prognosi ed in corso di terapia, il valore delle CTC potrebbe fungere da utile parametro per valutare la risposta al trattamento, permettendo di individualizzarla e minimizzarne così gli effetti avversi. La rilevazione delle CTC nella circolazione sanguigna dei pazienti, anni prima l'inizio della malattia metastatica, potrebbe portare all'uso delle CTC per il monitoraggio non invasivo di sensibilità o resistenza al trattamento, oltre a consentire una selezione dei pazienti che necessitano di una precoce terapia antitumorale sistemica. Inoltre la caratterizzazione morfologica e biomolecolare delle CTC, potrebbe consentire di fare diagnosi specifiche di neoplasia, usando un semplice prelievo ematico, senza ricorrere alle tecniche invasive attualmente indispensabili (Biopsia liquida) e potrebbe aiutare ad identificare nuovi target terapeutici per bloccare il processo metastatico. Ciò nonostante, ad oggi, il rilevamento e l'isolamento di CTC è tecnicamente molto impegnativo; in primo luogo perché il loro numero è estremamente esiguo (1 CTC ogni 10⁶-10⁹ cellule ematiche, circa una CTC per miliardo di cellule nucleate del sangue nei pazienti con neoplasia avanzata), e in secondo luogo perché esse sono biologicamente molto eterogenee tra loro.

Gran parte delle nostre conoscenze attuali riguardo i processi coinvolti nelle metastasi tumorali è stata derivata da modelli murini. Ad esempio le CTC isolate in modelli murini di tumore prostatico hanno dimostrato l'importanza di alcune vie biologiche che conferiscono, a queste cellule, resistenza all'apoptosi. In un modello murino di tumore al seno, le cellule tumorali disseminate (DTC o disseminated tumor cells) nel midollo osseo sono state rilevate nella fase "pre-maligna" del tumore, suggerendo una diffusione precoce di queste cellule agli organi distanti. Studi sugli effetti della transizione EMT nella generazione delle CTC e delle metastasi hanno suggerito che questa trasformazione mesenchimale può migliorare la capacità di queste cellule di dirigersi facilmente nel lume vasale e quindi nel sangue, ma può ridurre la loro capacità di avviare metastasi manifeste. In altri studi sono state inoltre isolate le cellule progenitrici ematopoietiche provenienti dal midollo osseo, che esprimono il recettore VEGF 1 (VEGFR 1), il quale può formare una nicchia "pre-metastatica" che precede l'arrivo delle cellule tumorali. Kim et al. nel 2009 [317] hanno proposto il nuovo concetto di tumor self seeding, ossia di tumore che si "autotrapianta", secondo il quale, iniettando linee cellulari tumorali, queste possono colonizzare un deposito tumorale preesistente, portando ad un nuovo reclutamento di cellule tumorali; in questo modo viene conferita maggiore aggressività al tumore già presente. Anche se istruttivi, però, questi studi non sempre sono stati convalidati da studi in tumori umani.

In ogni caso una migliore comprensione dell'identità precisa delle CTC e dei fattori che le rendono capaci di entrare nel circolo sanguigno sarebbe fondamentale per capire la chiave

del processo metastatico e per creare nuovi approcci terapeutici mirati a bloccarlo. Numerosi studi hanno messo in luce la capacità delle CTC, identificate in modelli di trapianto di carcinoma prostatico, di attivare un pathway in grado di dar loro resistenza all'apoptosi. Nonostante questi studi murini offrano dati interessanti sul meccanismo metastatico, hanno purtroppo alcune limitazioni: i modelli murini con l'utilizzo di linee cellulari neoplastiche umane infatti non riescono a ricreare la complessa relazione con la vascolarizzazione ed il microambiente circostante presente nelle neoplasie endogene. D'altra parte molti esperimenti effettuati su linee cellulari di neoplasie endogene murine hanno messo in luce come queste metastatizzano tardi o non metastatizzano affatto. Dunque sebbene la prima scoperta di CTC in un paziente con neoplasia avanzata risalgia al 1869, quando Ashworth descrisse la presenza di CTC durante l'autopsia di un paziente deceduto per malattia metastatica, ancora oggi le nostre conoscenze sono limitate. In assenza di una tecnica riconosciuta come gold-standard per identificarle, lo scopo ultimo della ricerca sulle CTC negli ultimi anni è stato quello di isolarle efficacemente, vitali ed intatte, dal sangue periferico, con una specificità tale da distinguerle facilmente dal vasto numero di cellule del sangue che le circondano.

3.1. Tecniche di isolamento delle CTC

Il rilevamento delle CTC nel sangue periferico dei malati di cancro rappresenta una grande promessa, e molte tecnologie entusiasmanti sono state sviluppate nel corso degli ultimi anni. Le CTC si osservano in concentrazioni estremamente basse, nell'ordine di una CTC sullo sfondo di milioni di cellule ematiche. La loro identificazione e caratterizzazione richiede metodi analitici estremamente sensibili e specifici, i quali sono di solito una combinazione di procedure di arricchimento e di rilevamento (Figura 6). L'arricchimento delle CTC include un largo pannello di tecnologie basate sulle differenti proprietà delle CTC, che le distinguono dalle normali cellule ematiche che le circondano. Queste caratteristiche comprendono proprietà fisiche (dimensione cellulare, densità, carica elettrica o polarizzazione, deformabilità) e proprietà biologiche (espressione delle proteine di superficie, vitalità e capacità di invasione).

Le CTC isolate secondo le loro proprietà fisiche (dimensione, densità, carica elettrica, deformabilità) non necessitano di essere marcate. I metodi d'isolamento delle CTC basati sulle proprietà fisiche includono:

- density gradient centrifugation, ossia la centrifugazione che permette la separazione delle cellule del campione ematico secondo gradiente e densità ("Ficoll", "Onco Quick");
- separazione attraverso speciali filtri come ISET (Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells) o un nuovo microfiltro tridimensionale;
- un nuovo e versatile biochip "label-free", che sfrutta la differenza delle dimensioni e della deformabilità delle CTC per la loro identificazione (che risultano più larghe e più rigide delle cellule ematiche);
- un dispositivo che combina la MOFF (o multi-orifice flow fractionation) e la DEP (dielectrophoretic cell separation technique);
- un dispositivo denominato DEP-FFF (o dielectrophoretic field-flow fractionation), il quale permette l'isolamento delle CTC vitali grazie alla differente risposta alla

dielettroforesi, dovuta alle differenze di proprietà della membrana e alla grandezza cellulare.

3.1.1. CellSearch® - Veridex

Le proprietà biologiche sono principalmente “chiamate in causa” nelle procedure immunologiche, con anticorpi che legano antigeni tumore-associati (selezione positiva) o l’antigene leucocitario comune (CLA) CD45 (selezione negativa). Il sistema immunomagnetico prevede che il complesso antigene-anticorpo sia marcato da un composto magnetico (ad esempio “sfere di ferro” o Ferrofluid per il sistema Veridex), il quale viene isolato tramite esposizione ad un campo magnetico. La selezione positiva usualmente è realizzata tramite anticorpi diretti contro molecole di adesione cellulare epiteliale (le EpCAM) e il successivo isolamento immunocitologico delle CTC viene eseguito con anticorpi che legano le citocheratine, ossia i filemanti intermedi delle cellule epiteliali. Un esempio della tecnologia basata sugli EpCAM è il sistema CellSearch®, che attualmente è il “gold standard” di tutti i nuovi metodi di isolamento delle CTC. La Figura 6 riassume le proprietà fisiche e biologiche delle CTC che sono usate per isolarle in un campione ematico.

Le attuali conoscenze delle proprietà biologiche delle CTC sono state limitate, in un recente passato, dalla difficoltà di sviluppare tecniche in grado di isolarle in numero sufficiente e in condizioni compatibili con l’effettuazione di successivi studi molecolari e funzionali. Dei vari metodi per l’isolamento delle CTC nel sangue periferico; quelli più “popolari” sono riassunti nella Tabella 4.

L’*arricchimento* di CTC dal sangue periferico di pazienti oncologici si basa sulle proprietà fisiche o biologiche delle CTC. In a) le proprietà fisiche comprendono le dimensioni cellulari (dispositivi di filtraggio a membrana), la deformabilità (sistema microfluidico in un chip), la densità (sistema Ficoll) e la carica elettrica (dielettroforesi). In b) le proprietà biologiche sono espressione di marcatori di superficie e di capacità invasive. I markers di superficie comprendono le EpCAM per la selezione positiva e il CD45 per la selezione negativa; anticorpi anti-EpCAM o anti-CD45 coniugati con sferule magnetiche, sono adoperati per arricchire le CTC immerse in un campo magnetico.

L’isolamento immunocitochimico delle CTC nel sangue periferico è di solito eseguito in combinazione con la centrifugazione del campione, procedure immunomagnetiche o metodi di “size filtration” per arricchire le cellule tumorali prima del loro rilevamento.

L’unico metodo approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) per l’isolamento delle CTC per il tumore della mammella, della prostata e del colon-retto in fase avanzata è il Sistema CellSearch® by Veridex / Johnson & Johnson (NJ, USA). Questo metodo è diventato il gold standard nella ricerca delle CTC. CellSearch è un metodo semiautomatico che arricchisce le CTC del sangue con nanoparticelle di Ferrofluid legate agli anticorpi anti-EpCAM. Il metodo CellSearch misura il numero di CTC identificate in 7.5 ml di sangue intero, è stato testato in diversi studi, per identificare pazienti con tumore metastatico a cattiva prognosi ed è stato utilizzato inoltre per valutare, soprattutto in pazienti con neoplasia mammaria, la risposta alla terapia sistemica. CellSearch è un sistema completamente automatizzato per l’isolamento delle CTC e ha mostrato di essere riproducibile nei vari laboratori. Come già accennato l’arricchimento immunomagnetico è

basato sull'utilizzo di nanoparticelle di ossido di ferro marcate con EpCAM, e sulla conseguente identificazione di CTC positive per la citocheratina. Sono considerate CTC quelle cellule che esprimono le citocheratine, ma mancano dell'espressione del CD45 (CD45-), e che hanno le caratteristiche citomorfologiche di tumore (quindi determinate dimensioni, presenza di un nucleo e un caratteristico rapporto nucleo/citoplasma). Le nanoparticelle di ferro sono rivestite di un polimero (diametro di 120-200 nm), il quale permette l'attacco degli Anti-EpCAM e dell'analogo della biotina. Si forma così una nanoparticella, che prende il nome di Anti-EpCAM Ferrofluid, in grado di legare sia la già citata biotina, sia la streptavidina, la quale lega, a sua volta, gli Anti-EpCAM. Affinché si possa identificare una CTC, la cellula tumorale viene messa a contatto con la soluzione di Anti-EpCAM Ferrofluid, che lega la CTC. Viene quindi aggiunta la streptavidina, che va a posizionarsi sugli analoghi della biotina legati alla nanoparticella di ferro. Viene aggiunto altro Anti-EpCAM Ferrofluid, il quale va a legarsi ai complessi CTC/Anti-EpCAM Ferrofluid/streptavidina, amplificando così il volume delle nanoparticelle ferrose. Viene aggiunta inoltre la biotina, che si lega alla streptavidina, rilasciando l'eccesso dell'Anti-EpCAM Ferrofluid. In questo modo solo le nanoparticelle di ferrofluid necessarie rimarranno legate alla CTC. Per riassumere, il campione di sangue da analizzare viene centrifugato e ne viene aspirato il plasma; viene aggiunto il tampone e il Ferrofluid; viene incubato tra due magneti; la soluzione, contenente le cellule non ancora marcate, viene quindi aspirata; vengono rimossi i magneti e le cellule marcate vengono risospese in tampone; infine vengono aggiunti i reagenti coloranti. La Figura 7 indica gli strumenti utilizzati nei laboratori per la ricerca delle CTC:

3.1.2. SceanCell

L'importanza delle CTC è suggerita dall'osservazione che i livelli elevati di CTC sono associati a diminuita sopravvivenza [318], un risultato che è stato dimostrato in sperimentazioni cliniche prospettiche. Nel loro studio di riferimento, Cristofanilli e colleghi hanno misurato CTC in 177 pazienti con carcinoma mammario metastatico diagnosticato e trattato [319]. Gli autori determinano che un cut-off di 5 CTC per 7,5 ml di sangue potrebbe classificare i pazienti in gruppi a più alto o rischio di recidiva. Gli studi precedenti hanno convalidato l'utilità prognostica dell'informazione CTC nel cancro al seno (BC), nel cancro del colon-retto (CRC) e nel cancro alla prostata (PC) [320].

Tuttavia, la semplice enumerazione di CTC non è sufficiente; e da questi studi è emerso che il cancro non è una malattia unica, omogenea, ma piuttosto una costellazione di malattie con una varietà di alterazioni patologiche che influenzano la prognosi. Per complicare ulteriormente le cose, il recente apprezzamento dell'eterogeneità delle alterazioni genetiche e dell'espressione del biomarker [321], come HER2 e KRAS, all'interno dei tumori significa che un singolo campione di biopsia non è più adeguato.

L'analisi di CTC ha il potenziale per consentire una accurata valutazione dei biomarcatori a fronte dell'eterogeneità dei tumori. Recenti studi suggeriscono che le informazioni CTC rappresentino lo spettro di informazioni molecolari e cellulari proprie del tumore primario [322]. Inoltre, l'accessibilità alle CTC attraverso un semplice campione di sangue le rende una fonte attraente di cellule tumorali per monitorare seriamente l'espressione dei biomarcatori.

Le CTC sono tipicamente presenti a concentrazioni estremamente basse. La rarità delle CTC ha rappresentato una sfida per il loro utilizzo per affrontare questi problemi. Mentre l'isolamento immunomagnetico (CellSearch® – Veridex) utilizzando gli anticorpi della molecola di adesione cellulare epiteliale (EpCAM) ha consentito una più ampia applicazione clinica, gli inconvenienti di questa tecnologia includono l'impossibilità di isolare le cellule che non esprimono EpCAM [323] e l'incapacità di elaborare le cellule per l'analisi di biomarcatori [324].

Altri metodi di arricchimento usano proprietà fisiche delle cellule maligne come la dimensione. Il ruolo prognostico delle CTC in altri tumori epatici come il carcinoma epatocellulare è stato approfondito, principalmente negli studi che utilizzano metodi di acquisizione basati su EpCAM.

Dati dagli studi di espressione genica suggeriscono che solo una piccola frazione (10% - 20%) dei carcinomi epatocellulari esprime EpCAM, quindi è possibile che la conta di CTC possa essere sottovalutata in questi studi. È interessante notare che, alcune di queste studi hanno analizzato anche particolari caratteristiche genetiche all'interno delle CTC, per accertare il loro potenziale come driver della formazione di metastasi.

La nuova generazione di tecnologie di analisi CTC deve consentire l'analisi molecolare di CTC, oltre ad una precisa enumerazione di CTC nei campioni di sangue del paziente. I dispositivi ScreenCell® descritti qui di seguito riguardano entrambi questi problemi tecnici, consentendo l'isolamento rapido, coerente e poco costoso di CTC da campioni di sangue per uso clinico o di ricerca.

Il dispositivo ScreenCell® è un dispositivo autonomo e monouso per l'isolamento di cellule rare da campioni di sangue. Sono disponibili tre configurazioni del dispositivo ScreenCell® che soddisfano diverse esigenze di analisi: ScreenCell® Cyto per l'enumerazione e la citologia delle cellule, ScreenCell® CC per la cultura di CTC e ScreenCell® MB per l'analisi molecolare. I dispositivi condividono un principio fondamentale per l'isolamento CTC; inoltre, ogni tipo ha caratteristiche specializzate che supportano applicazioni specifiche.

Il dispositivo ScreenCell® è stato progettato per catturare CTC dai campioni di sangue intero in base alla selezione delle dimensioni. Il dispositivo utilizza filtri a membrana microporosa per catturare CTC in condizioni standardizzate. Le condizioni standardizzate sono state sviluppate per supportare l'analisi a valle dei CTC catturati, come l'enumerazione, l'immunohistochemistry e l'isolamento dell'acido nucleico.

I dispositivi ScreenCell® sono selettivi per le dimensioni, sfruttando la grande dimensione delle CTC rispetto alle cellule del sangue nucleate per l'isolamento [325]. I dispositivi sono costituiti da un serbatoio di filtrazione e da un filtro microporoso a membrana con pori di dimensioni definite in un portaugello rimovibile (Figura 8). Il campione viene diluito con tampone di filtrazione e quindi il campione diluito viene passato attraverso una membrana di filtrazione microporosa applicando un vuoto dal lato di deflusso. Il tempo necessario per l'elaborazione del campione è inferiore a tre minuti. La membrana di filtrazione permette il passaggio di cellule del sangue nucleate ma conserva CTC. La membrana con le cellule catturate viene espulsa dal dispositivo per ulteriori manipolazioni. Questa configurazione supporta una gamma di potenziali applicazioni, tra

cui l'immunocitochimica, l'analisi della espressione genica e la cultura delle cellule isolate [326].

I risultati pubblicati indicano che il dispositivo Cyto ScreenCell® può isolare in modo efficiente le cellule H2030 di carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) impiantate nel sangue intero prelevato da un donatore sano [327]. Per dimostrare questo, 2 o 5 cellule sono state micropipettate in 1 ml di sangue intero seguite dalla procedura di isolamento standard proposta dal produttore. In campioni che hanno ricevuto 5 cellule per ml di sangue, sono state recuperate una media di $4,56 \pm 0,71$ (recupero del 91%), mentre una media di $1,48 \pm 0,71$ cellule sono state recuperate da campioni che ricevono 2 cellule per ml (recupero del 74%). Gli esperimenti di controllo hanno permesso di recuperare rispettivamente 88 e 82% per 5 e 2 cellule, suggerendo che la perdita di cellule è dovuta alla procedura di pipettazione anziché alla filtrazione.

La vitalità delle cellule dopo il recupero è stata testata filtrando direttamente 50 cellule H2030 in tensione attraverso il dispositivo CC ScreenCell®. Dopo la filtrazione, il filtro a membrana microporosa è stato rimosso e la vitalità delle cellule è stata testata mediante esclusione di tripan blu. Più del 90% delle cellule sono state recuperate e la vitalità delle cellule isolate è stata dell' $85\% \pm 9\%$.

L'utilità del dispositivo ScreenCell® Cyto per l'enumerazione di CTC, l'analisi citologica e l'analisi delle mutazioni genetiche è stata dimostrata in una serie di 23 pazienti con melanoma cutaneo, quindi con un tipo di cellule che non esprime EpCAM [327]. I campioni di sangue sono stati ottenuti prima della resezione chirurgica del tumore primario e al primo post-intervento di follow-up. Il recupero mediano di CTC era di 1 CTC per 2 mL (range: da 0 a 11) sangue periferico disegnato prima dell'intervento chirurgico. 16 dei 23 pazienti erano CTC-positivi. Post-chirurgia il numero mediano è rimasto di 1 CTC (range: da 0 a 3), con 15 di 23 pazienti CTC-positivi.

L'esame microscopico delle CTC di melanoma isolate ha rivelato una tipica morfologia maligna, con anisocariosi e un elevato rapporto nucleocitoplasmatico. Le cellule erano morfologicamente identiche alle cellule del tumore primario ed esprimevano mart1 / melan-A, dimostrando l'appartenenza alla linea cellulare melanocitaria. L'espressione di mart1 / melan-A era eterogenea nelle CTC, come nel tumore primario. Questi risultati mostrano che il dispositivo ScreenCell® può consentire l'accesso a tipi di cellule negative di EpCAM.

Il dispositivo ScreenCell® MB supporta la medicina personalizzata, come illustrato dall'uso del dispositivo per isolare il DNA da cellule di melanoma del paziente per la genotipizzazione. Il DNA isolato da CTC catturato con il dispositivo è stato sottoposto ad amplificazione dell'intero genoma seguito da sequenziamento per identificare i pazienti con la mutazione BRAF V600E, target delle terapie anti-BRAF (vemurafenib, dabrafenib, ecc...). I dati di sequenza hanno rivelato una trasversione da T ad A nel nucleotide 1799 in alcuni pazienti caratterizzati dalla mutazione V600E, suggerendo la candidatura alla terapia con vemurafenib.

Questo studio su pazienti affetti da melanoma dimostra che il dispositivo ScreenCell® Cyto può isolare in modo affidabile i CTC EpCAM negativi dai campioni di pazienti per l'enumerazione, l'immunocitochimica e l'analisi genetica. Risultati simili sono stati ottenuti con i principali tumori derivanti da epitelio: tumore polmonare non a piccole cellule

(NSCLC), adenocarcinoma mammario (BC) e cancro coloretale (CRC). I dispositivi ScreenCell® possono essere usati per isolare CTC dai campioni di pazienti in ciascuno dei principali tipi di cancro istologici indipendenti dall'espressione del biomarker superficiale. Le cellule tumorali catturate sono idonee all'analisi con una vasta gamma di tecnologie per supportare la ricerca e la pratica della medicina personalizzata. Le tecnologie supportate per l'analisi a valle includono IHC, FISH, sequenziamento del DNA, matrici di espressione genica e coltura cellulare. Di seguito sono riportate alcuni esempi di applicazioni che supportano il monitoraggio dello stato del biomarker.

Come esempio dell'utilità dei dispositivi ScreenCell® per monitorare lo stato del biomarker clinicamente rilevante, l'espressione HER2 è stata analizzata in BC CTC isolati con il dispositivo Cyto ScreenCell®. IHC con anticorpo anti-HER2 ha dimostrato che i CTC erano fortemente HER2-positivi, così come il tumore primario. In altri campioni da un paziente con tumore primario di HER2-negativo BC, CTC-HER2-positivi sono stati isolati dal sangue periferico, suggerendo un'evoluzione continua del tumore durante la progressione, come riportato dagli altri [328].

Il monitoraggio del biomarker con FISH è un altro esempio di una tecnologia che può essere monitorata tramite CTC isolate utilizzando dispositivi ScreenCell®. In questo esempio, la visualizzazione quantitativa del gene del recettore del fattore di crescita epidermico umano (EGFR) è stata dimostrata in cellule CRC HT29 intrecciate nel sangue intero umano. Dopo l'isolamento con un dispositivo Cyto ScreenCell®, le cellule sono state ibridate con il mix di sonde FISH per EGFR e centromero 7 direttamente sul filtro a membrana microporosa come descritto in precedenza. 8. La microscopia quantitativa di fluorescenza ha rivelato diverse ibridizzazioni EGFR per cellula, indicando duplicazione del gene 2 segnali CEN-7 per cellula, dimostrando la polisomia del cromosoma 7. Questi tipi di dati possono facilitare l'applicazione diagnostica della compagnia di analisi CTC.

La capacità di analizzare la proliferazione di CTC vitali è mancata finora. Questa dimensione delle proprietà biologiche dei CTC è particolarmente rilevante per la ricerca di base sulla metastasi e per lo sviluppo di farmaci. Il dispositivo ScreenCell® CC è stato progettato per supportare la cultura di CTC validi dopo l'isolamento. Le cellule NSCLC coltivate sono state inserite in campioni di sangue normali poi isolati usando dispositivi ScreenCell® CC. Dopo la procedura di isolamento, le cellule sono state coltivate direttamente sul dispositivo filtro microporoso a membrana in piastre multistrato.

La capacità di proliferazione in vivo viene mantenuta anche dalle cellule isolate utilizzando questo dispositivo. In un esperimento separato, le cellule sono state isolate come sopra usando il dispositivo ScreenCell® CC, quindi il filtro a membrana microporosa è stato impiantato sottocutanea in un topo immunocompromesso, sviluppandosi in ultima analisi in un tumore sottocutaneo. La possibilità di coltivare regolarmente CTC dai campioni di pazienti apre la porta allo sviluppo di metodi analitici potenzialmente innovativi per la gestione delle malattie.

Ulteriori applicazioni cliniche e di ricerca possono essere previste. Queste includono valutazioni iniziali di pazienti sospettati di ospitare malattie maligne, sulla base della squisita specificità dei CTC per malattie maligne. La sequenza di DNA a cellule singole e altre tecnologie genomiche all'avanguardia per la personalizzazione della terapia sono anche compatibili con il dispositivo ScreenCell®. Infine, è possibile analizzare altri tipi di

cellule che appaiono a bassi livelli nella circolazione periferica, come le cellule fetali o le cellule endoteliali circolanti.

Negli ultimi 40 anni sono stati fatti enormi progressi nella definizione dei meccanismi molecolari di oncogenesi. Questi progressi concettuali in avanti nella comprensione del funzionamento interno del cancro sono stati applicati per sviluppare la medicina personalizzata per il cancro. In questo schema, i CTC possono avere un ruolo importante sia nel laboratorio di ricerca che nella clinica. A causa del loro ruolo nella metastasi e nella loro accessibilità, le informazioni da parte dei CTC hanno la promessa di assistere non solo nella prognosi di molti, se non di tutti i tumori, ma anche per aiutare a definire regimi terapeutici individuali.

Al fine di raggiungere questa visione, sono necessarie tecnologie migliorate per l'accesso ai CTC ordinariamente da campioni di pazienti. Mentre i metodi basati sull'arricchimento EpCAM hanno portato informazioni CTC alla clinica, avanzare sarà un ruolo importante nella definizione dell'uso delle informazioni CTC per nuove tecnologie, come ScreenCell®, che sono largamente applicabili all'isolamento CTC e possono supportare tecniche di analisi a valle. La facilità d'uso e la flessibilità dei dispositivi ScreenCell® consentiranno di rendere disponibile la tecnologia a più laboratori e cliniche. L'accesso supplementare a CTC accelererà l'utilizzo delle informazioni CTC in entrambe le impostazioni.

4. PREMESSE E RAZIONALE DELLO STUDIO

4.1. CARATTERIZZAZIONE DELLE CSC

4.1.2. DCLK1

Doublecortin-like kinase 1 (DCLK1) è uno dei più interessanti membri della famiglia delle *doublecortin*, che include 11 membri interessati nello sviluppo neuronale e condivide il dominio che lega la tubulina. Il gene *Dclk1* è uguale alla *doublecortin* nel dominio N-terminale legante i microtubuli, ma il dominio C-terminale è simile a quello della *chinasi II Ca²⁺/calmodulina-dipendente*. Sebbene il ruolo di DCLK1 non sia ancora chiaro, si pensa che possa essere sovrapponibile a quello di altre *doublecortin*, cioè intervenire nella formazione del citoscheletro, regolando la motilità cellulare e la migrazione assonale. Un'altra teoria ipotizza, invece, che DCLK1 abbia un ruolo portante nella proliferazione cellulare, tramite il legame con i microtubuli. I molti siti di fosforilazione e i domini transmembrana suggeriscono un possibile coinvolgimento nelle vie di segnalazione [329]: nel tumore del colon-retto, ad esempio, si assiste a una iper-espressione di DCLK1 a seguito dell'attivazione della via di Notch-1 [330]. Sembra inoltre che l'iper-espressione di DCLK1 in soggetti con infezione cronica da *Haepatitis C Virus* (HCV) promuova la tumorigenesi tramite diverse vie di segnalazione quali S100A9/NF-κB e C-Myc.

Il gene *Dclk1* è molto espresso nel sistema nervoso centrale fetale e adulto, sebbene livelli più bassi del trascritto sono stati ritrovati nel cuore, nel fegato, prostata, piccolo intestino e colon. Più recentemente è stato visto che DCLK1 è presente nelle zone della mucosa gastrica murina ricche in cellule staminali ed è stato proposto come nuovo marcatore di cellule staminali [329]. (Fig. 9)

4.1.2.1. DCLK1 COME MARCATORE DI CELLULE STAMINALI E DI CSC

Dopo la rilevazione di DCLK1 in diverse aree staminali dell'apparato gastrointestinale, tanto a livello esofageo quanto gastrico, Gagliardi e colleghi [329] hanno studiato nel 2012 l'espressione di questo gene nel colon umano. Si è evidenziato che DCLK1 è presente nel 60% delle cripte del colon ed è maggiormente localizzato in posizione 1-4 della cripta (Figura 10), ossia nel compartimento staminale del fondo. Queste cellule sono morfologicamente paragonabili a cellule enteroendocrine e alcune di esse mostrano una co-espressione con LGR5: mentre DCLK1 è riscontrabile, seppur raramente, al di sopra della base della cripta, solo le cellule in posizione +4 mostrano la co-espressione di DCLK1 e LGR5 e proprio queste rappresenterebbero il *pool* di cellule progenitrici.

Per quanto riguarda i tumori, DCLK1 è espresso in molte neoplasie gastrointestinali, ad esempio nell'adenocarcinoma del colon, del pancreas e nell'HCC. Più precisamente nel 78% degli adenomi del colon-retto e nel 75% dei carcinomi è stata notata immunoreattività per DCLK1 e questo dato suggerisce che la *upregulation* di DCLK1 potrebbe essere un evento precoce nel processo di tumorigenesi del carcinoma del colon-retto [331]. A sostegno di questa ipotesi, si è dimostrato come cellule neoplastiche del colon che esprimono specificamente DCLK1 e LGR5 sostengono continuamente la progenie tumorale nei polipi di topi *ApcMin/+* e la specifica ablazione di queste cellule comporta una evidente regressione dei polipi, senza recare danno all'epitelio sano. Queste cellule DCLK1/LGR5+ rappresentano un potenziale target nelle neoplasie di derivazione endodermica [332].

Biopsie effettuate su esofago con metaplasia di Barrett o adenocarcinoma esofageo hanno mostrato immunoreattività significativa di DCLK1 e LGR5, mentre nel fegato è stata valutata l'immunoreattività di DCLK1 su HCC e su cirrosi avanzata, con e senza carcinoma. I risultati ottenuti da questa analisi hanno dimostrato un aumento dell'espressione di DCLK1 negli epatociti, nei dotti biliari e nel tessuto stromale in parallelo alla progressione neoplastica da fegato sano a HCC [329]. A livello pancreatico è stata segnalata una iper-espressione di DCLK1 nei tumori e nelle neoplasie intraepiteliali (*PanIN*) [333]. Lo studio di Weigant *et al.* [333] è andato a dimostrare inoltre la potente inibizione di DCLK1 nei tumori del pancreas e del colon da parte di una chinasi chiamata LRRK-2-IN-1: è stato osservato che l'attività di questa molecola la proliferazione, la migrazione e l'invasività delle cellule tumorali, in più la sua alta affinità per DCLK1 ne comporta l'inibizione dell'attività chinasica, riducendo l'effettore di DCLK1 c-Myc [333].

4.1.2.2. DCLK1 e CCA

Esistono somiglianze tra le PBGs, le ghiandole duttali pancreatiche (*Peri Ductal Glands*-PDGs) e le cripte del colon in termini di componenti cellulari e cellule staminali/progenitrici e questo può essere giustificato dalla comune origine embriologica. Queste similitudini a livello delle nicchie staminali potrebbero spiegare l'esistenza di patologie che interessano contemporaneamente questi tre organi (ad esempio la rettocolite ulcerosa, la pancreatite autoimmune e la PSC o la somiglianza dei tumori che interessano l'albero biliare, il pancreas e il colon [332]. Più precisamente, è sempre più evidente che il CCA mucinoso abbia una origine ghiandolare (derivante dalle hBTSCs delle PBGs) e ciò spiegherebbe le somiglianze con l'adenocarcinoma duttale del pancreas, di derivazione

dalle PDGs, e il tumore del colon-retto, che originerebbe dalle cellule staminali nel fondo delle cripte. Inoltre l'organizzazione anatomica delle cellule all'interno delle PBGs è sovrapponibile a quella delle cripte del colon, in cui si ritrova il compartimento staminale LGR5+ nel fondo della cripta, le cellule progenitrici LGR5- (o del compartimento trans-amplificante) in posizione centrale e le cellule *committed* a livello del colletto della cripta stessa. Uno studio di Carpino *et al.* del 2012 [332] ha mostrato come nelle PBGs si ripropone lo stesso modello tanto anatomico quanto immunofenotipico: le cellule alla base della ghiandola mostrano un fenotipo indifferenziato e sono LGR5+, mentre la popolazione amplificante suggerisce un fenotipo intermedio, perde la positività per LGR5, diventa EpCAM+ e si differenzia progressivamente nelle cellule mature migrando verso il colletto della PBG.

Non esistono studi sulla presenza di DCLK1 nel CCA, ma la stretta connessione embriologica con il colon-retto della forma mucinosa [9] ha suggerito di osservarne l'effettiva espressione.

4.2. DOSAGGIO DELLE CTC NELLA PRATICA CLINICA

Nel 2004, lo studio condotto da Cristofanilli *et al* [319] ha dimostrato, per la prima volta, che il numero delle CTC rappresenta un fattore prognostico indipendente in termini di sopravvivenza libera da progressione (progression free survival, PFS) e sopravvivenza globale (overall survival, OS). Più recentemente la FDA, basandosi principalmente sui risultati degli studi di Cohen *et al* e Miller *et al*, ha approvato la metodica CellSearch™ System per la valutazione prognostica dell'andamento della malattia e per il monitoraggio della risposta al trattamento in pazienti con tumore metastatico alla mammella, prostata e colon-retto. Più specificatamente, per quel che riguarda il CCR in fase avanzata, un cut-off di 3 o più CTC per 7,5 ml di sangue intero, è stato validato come quello più adatto per stratificare i pazienti in due categorie: a buona ed a cattiva prognosi. Sia la PFS che la OS si sono dimostrate essere significativamente inferiori nei pazienti con valori basali di CTC ≥ 3 . Al contrario, nei pazienti con CCR metastatico, nessuna significativa differenza prognostica è stata evidenziata per quel che riguarda gli abbassamenti o gli innalzamenti del valore di CTC durante terapia. Questi dati sono in contrasto con quelli riguardanti le neoplasie mammarie avanzate, in cui invece è stato dimostrato un chiaro valore prognostico delle variazioni di CTC sopra il valore cut off di 5 CTC/7,5 ml in corso di terapia. Questo ci suggerisce che, per quel che riguarda i pazienti con CCR metastatico, il cut off di 3 CTC non può essere usato come procedura di routine per monitorare il decorso della malattia e la risposta ai trattamenti e che probabilmente non è in grado di stratificarli prognosticamente in maniera corretta.

4.2.1. CTC NEL COLANGIOCARCINOMA

Presso la Mayo Clinic di Rochester tra giugno 2010 e settembre 2014, ben 88 pazienti con CCA sono stati arruolati prospettivamente [334]. Il sistema CellSearch di Veridex è stato utilizzato per la rilevazione di CTC nel sangue periferico. Le associazioni tra CTC, le caratteristiche del paziente e del tumore e la sopravvivenza sono state esaminate usando il modello di rischio proporzionale Cox. Quindici pazienti (17%) erano positivi per CTC ≥ 2 e 8 pazienti (9%) per CTC ≥ 5 . CTC sono stati associati con l'estensione del tumore. CTC ≥ 2 (p

= 0,02) e CTC ≥ 5 ($p = 0,01$) erano entrambi predittori indipendenti della sopravvivenza. Nelle analisi di sottogruppi CTC ≥ 2 ($p < 0,01$) e CTC ≥ 5 ($p = 0,02$) erano entrambi associati a una più breve sopravvivenza tra i pazienti con metastasi. C'è stato un trend verso l'associazione di CTC ≥ 5 con una sopravvivenza più breve in pazienti con CCA non metastatico (HR 4,3; $p = 0,06$). CTC ≥ 2 (10,5; $p < 0,01$) e CTC ≥ 5 (HR 10,2; $p = 0,02$) erano entrambi associati a una sopravvivenza più breve tra i pazienti con CCA perilare / distale. CTC ≥ 5 è stato associato con una sopravvivenza più breve di pazienti con CCA intraepatico (HR 4,2; $p = 0,04$).

CTC erano associate a caratteristiche tumorali più aggressive e indipendentemente associate alla sopravvivenza in pazienti con CCA.

Lo studio ha alcune limitazioni. La prima riguarda il metodo di cattura, che si basa sull'espressione EpCAM e potrebbe eventualmente perdere CTC EpCAM negative, quindi il numero effettivo di CTC potrebbe essere sottovalutato. Valutare, in parallelo, l'espressione EpCAM nel tessuto tumorale con l'enumerazione di CTC potrebbe aiutarci a capire l'entità di questa limitazione. Inoltre, la popolazione di pazienti inclusi è piuttosto eterogenea, che va dai pazienti nelle prime fasi di malattia trattati con interventi chirurgici a quelli con metastasi che hanno ricevuto trattamenti con chemioterapia. Insieme a ciò, alcune analisi per sottogruppi potrebbero essere realizzate per acquisire con precisione le differenze prognostiche.

Nonostante questo, lo studio fornisce una prova iniziale del ruolo prognostico delle CTC in CCA e rafforza ulteriormente la nozione che i biomarker tumorali circolanti potrebbero un ruolo nel processo decisionale per i pazienti con CCA.

5. SCOPO DEL PROGETTO

Il modello staminale alla base del processo di cancerogenesi del CCA identifica due popolazioni cellulari diverse: la cellula d'origine (o *cancer initiating cell*), ovvero la cellula che acquisisce la prima mutazione che dà il via al processo di cancerogenesi (l'hHPC e l'hBTSC) e le CSC, le cellule che mantengono la crescita e la propagazione tumorale. Il fenotipo delle CSC e delle cellule d'origine si presume sia sostanzialmente diverso [18;19]. A sostegno di questa ipotesi sono stati individuati numerosi marcatori di staminalità all'interno del CCA, la cui entità di espressione correla con una peggiore prognosi. Sebbene nella maggior parte dei tumori solidi le CSC rappresentano circa il 3% della massa tumorale, nel CCA è stato osservato che >30% esprimono marcatori di staminalità, cosa che permette di focalizzare ancora di più l'attenzione sul ruolo delle CCA-CSC. Inoltre, tutti i marcatori proposti per le CSC sono espressi dalle cellule staminali normali site nei canali di Hering o nelle PBG, andando a individuare in queste strutture la probabile sede di origine della maggior parte dei CCA. D'altra parte, l'assenza di marcatori specifici limita la possibilità di sviluppare strategie che abbiano come bersaglio le CCA-CSC [3]. Individuare marcatori di staminalità di pertinenza esclusivamente tumorale consentirebbe una migliore e più precisa analisi quantitativa e qualitativa di CSC.

Inoltre, è evidente quindi che sarebbe vantaggioso poter disporre di un marcatore ematico che possa rivelarsi utile, se non in tutte, almeno in qualcuna delle fasi del management di

queste neoplasie. I classici marcatori siero-ematici hanno purtroppo in larga parte fallito in questi intenti.

Recentemente, EpCAM e CD133 sono risultati espressi da microparticelle in una biopsia liquida di pazienti con CCA e hanno mostrato significativi potenziali diagnostici e prognostici [324]. Più interessante potrebbe rivelarsi il dosaggio delle CTC, principalmente per quel che riguarda il loro valore prognostico e predittivo della risposta al trattamento, e potenzialmente anche per la possibilità di eseguire diagnosi molecolari direttamente sul sangue. È intuitivo come queste nuove metodiche porterebbero ad un abbassamento dei costi, con un conseguente aumento delle risorse disponibili da investire nella ricerca.

Come abbiamo avuto modo di leggere precedentemente, la valutazione di CTC mediante CellSearch di Veridex consente di individuare solo il 17% di pazienti positivi per CTC; questo nonostante, invece, l'alto tasso di recidive e progressioni di malattia nonché alta mortalità cancro correlata di questi pazienti. Una delle possibili spiegazioni ipotizzate è la transizione epitelio – mesenchimale di queste cellule che perdono l'espressione di EpCAM acquisendo l'espressione di marcatori cellulari mesenchimali; oppure in linea con la teoria dell'origine staminale del CCA, le CTC non individuate con CellSearch di Veridex potrebbero originare da CSC e pertanto esprimere i stessi marcatori cellulari.

Il nostro studio ha, quindi, come obiettivo di migliorare le nostre conoscenze in merito perseguendo due scopi principali:

- il primo scopo è valutare l'espressione di DCLK1 in sottopopolazioni di CCA-CSC selezionate per EpCAM, LGR5, CD90, CD13, CD133 nei due istotipi (mucinoso e misto) e gli effetti dell'inibizione di DCLK1 su vitalità e proliferazione delle cellule di CCA;
- il secondo scopo è valutare se la presenza di CTC, valutate con metodica Cell Search™ System (EpCAM+, CK8+/18+, DAPI+ e CD45-) e Screen Cell System (EpCAM, LGR5, CD90, CD13, CD133), nel sangue periferico di pazienti affetti da colangiocarcinoma, abbia un valore prognostico e se possa correlare con la risposta al trattamento terapeutico di prima linea. I parametri valutati sono stati il Response Rate (RR), la PFS e l'OS.

6. PAZIENTI, MATERIALI E METODI

Il nostro studio è stato condotto grazie alla collaborazione di più gruppi di ricerca, fra cui la UOC di Gastroenterologia Universitaria del Polo Pontino, "Sapienza" Università di Roma, l'Oncologia Universitaria della "Sapienza" Università di Roma (Polo Pontino) in collaborazione con il Dipartimento di Medicina Molecolare della "Sapienza" Università di Roma (Policlinico Umberto I) e la UOC di Anatomia Umana del Policlinico Umberto I di Roma "Sapienza" Università di Roma. Tale studio è sia di tipo retrospettivo che prospettico. Nell'analisi dei dati sono stati tenuti in considerazione alcuni parametri fondamentali come: l'età, l'Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Performance Status (PS), il grading ed il tipo istopatologico ed altri parametri, quando disponibili, come il numero di siti metastatici e la loro localizzazione. Nella nostra analisi prospettica potevano essere inclusi pazienti dai 18 agli 85 anni di età con diagnosi istologica di CCA in

fase avanzata. Sono stati arruolati pazienti con ECOG PS ≤ 1 , con un'adeguata funzionalità midollare (conta dei globuli bianchi $\geq 3.5 \times 10^3/\text{mm}^3$, conta dei neutrofili $\geq 2.0 \times 10^3/\text{mm}^3$, emoglobina $\geq 10 \text{ g / dl}$, conta piastrinica $\geq 100 \times 10^3/\text{mm}^3$), epatica (≤ 1.2 volte il limite massimo per bilirubina e ≤ 4 volte il limite massimo per AST e ALT), e renale (creatinina sierica $\leq 1.5 \text{ mg / dL}$). Tutti i pazienti dovevano avere frazione di eiezione (FE) a riposo $\geq 50\%$ e non dovevano avere una storia documentata di insufficienza cardiaca congestizia (CHF), gravi aritmie, o infarto del miocardio (nei 6 mesi precedenti al trattamento). Sono stati esclusi tutti i pazienti affetti da altre neoplasie, così come tutti quelli con altri gravi fattori di rischio o importanti disfunzioni d'organo. Inoltre non sono state considerate arruolabili tutte le donne in stato di gravidanza o in allattamento. Prima di eseguire il prelievo per il dosaggio basale del valore di CTC e dell'utilizzo dei dati personali e clinici, è stato richiesto a tutti i pazienti un consenso informato scritto.

Il materiale biotico, comprendente il tumore solido e il sangue, proveniente da pazienti sottoposti a resezione chirurgica, è stato ottenuto secondo protocollo autorizzato e approvato dai Comitati Etici degli Ospedali coinvolti nel progetto di ricerca: Policlinico Umberto I di Roma, Istituto nazionale tumori Regina Elena di Roma (IFO) e Policlinico Universitario Agostino Gemelli.

6.1. CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DELLE CSC DI CCA

6.1.1. ALLESTIMENTO COLTURE PRIMARIE DI CCA

Tale materiale è stato utilizzato per l'allestimento della coltura cellulare primaria. Il tessuto tumorale è stato frammentato meccanicamente e poi sottoposto a digestione enzimatica per mezzo di Collagenasi di tipo IV 1 mg/ml (Sigma #900121), DNAsi I 0.1 mg/ml (Sigma #31211) e Ialuronidasi 0.1 mg/ml (Sigma #9001541) solubilizzate in Terreno di coltura H69, la digestione è stata effettuata overnight a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO_2 . Poi i frammenti tissutali sono stati ulteriormente separati meccanicamente tramite l'uso di pipette a diametro decrescente e poi filtrati in sequenza prima con un filtro da $100\mu\text{m}$ e poi con uno da $70\mu\text{m}$. Infine, le cellule sono state piastrate su supporti idonei in terreno H69 (Tabella 5) e poi coltivate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO_2 .

In questo lavoro sono stati utilizzati CCA sia misti che mucinosi classificati secondo Komuta *et al.* (6). La classificazione è stata effettuata dall'ospedale che donava il tessuto tumorale e confermata da collaboratori esterni.

6.1.2. LINEE CELLULARI IMMORTALIZZATE

Nel presente lavoro sono state utilizzate delle linee cellulari immortalizzate oltre alle linee primarie. Tali linee sono le HT29 (adenocarcinoma di colon) e le NIH3T3 (fibroblasti umani immortalizzati). Le cellule sono state scongelate da campioni conservati in NUNC a -80°C , sono state centrifugate per eliminare il DMSO presente nella soluzione di congelamento e piastrate con terreno CCA10% per le HT29 e terreno NIH3T3 per le NIH3T3 (Tabella 5).

Tutte le cellule sono state piastrate e coltivate *in vitro* utilizzando supporti idonei, il cambio terreno è stato effettuato ogni 3 giorni e le cellule sono state passate quando raggiungevano la confluenza.

6.1.3. IMMUNOSELEZIONE o SEPARAZIONE MAGNETICA CON COLONNA LS

Le cellule staccate con tripsina e contaminate con il saggio del Trypan blue sono state lavate con DPBS 10 minuti e poi con Separation Buffer.

L'immunoselezione è stata effettuata tramite apposite colonne posizionate MACS separatore (Miltenyi #130-090-976). La sospensione cellulare, precedentemente incubata con l'anticorpo d'interesse (Tabella 5), è stata fatta percolare attraverso le colonne LS: l'eluato rappresenta le cellule negative non legate all'anticorpo, mentre le positive rimangono legate alla colonna. Queste sono state recuperate tramite pressione con lo stantuffo monouso, compreso nel kit, una volta rimossa la colonna dal separatore, questa è stata posta su una Falcon di raccolta da 50 mL pulita e riempita di 2 mL di Separation Buffer che è stato immediatamente pressato con lo stantuffo monouso. Questa ultima procedura si ripete due volte, per permettere la fuoriuscita dalla colonna le cellule positive, legate ai magneti della colonna.

6.1.4. RT-qPCR

La RT-qPCR è una tecnica di biologia molecolare che prevede la retrotrascrizione di RNA in cDNA e successivamente l'analisi quantitativa del gene ricercato nel suddetto cDNA. L'RNA totale è stato estratto dai campioni selezionati mediante TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) e 1-bromo-3-cloropropano 1:5. L'RNA così ottenuto è stato purificato tramite precipitazione alcolica con isopropanolo. Successivamente è stato effettuato un lavaggio con etanolo 75% a -20°C. L'RNA totale estratto è stato solubilizzato in 55 µL di acqua RNAsi free. La reazione è stata condotta in un volume totale di 20 µL usando come retrotrascrittasi la M-MLV. Ogni fase di questa reazione è stata realizzata mediante un termociclatore (Quantuarus).

Per la reazione di qPCR è stato utilizzato il kit SYBR® Green PCR Master Mix (ThermoFisher #600828). I primers utilizzati sono visualizzabili in tabella 2. La reazione è stata condotta in un volume finale di 25 µL contenente 1 µL di cDNA, 12.5 µL di 2 x 30 SYBR Green Brilliant QPCR Master Mix, 0.3 µL di ROX, 0.3 µL di primers forward, 0.3 µL di primers reverse e 10.6 µL di acqua RNAsi free. (Tabella 6)

La reazione di qPCR è stata effettuata in un termociclatore (MX3000P instrument. Agilent, La Jolla, CA, USA) e la fluorescenza è stata rilevata durante la fase di estensione di ogni ciclo e normalizzata per la fluorescenza del ROX (Fig. 11). È stato usato il GAPDH come *housekeeping* per permettere il confronto tra le diverse popolazioni e sottopopolazioni analizzate.

6.1.5. ESTRAZIONE, QUANTIZZAZIONE PROTEICA e WESTERN BLOT

Le proteine delle sottopopolazioni precedentemente immunoselezionate e le cellule non sortate sono state estratte tramite Ripa buffer addizionato con *protease inhibitor cocktail* (#P8340 Sigma) (1:100) e successivamente quantizzate con il metodo Bradford tramite Protein Assay Dye Reagent concentrate (#500-0006 Bio-Rad). Tali estratti proteici sono stati risolti tramite SDS-PAGE su un gel di poliacrilammide al 4-20% (Mini-PROTEAN®TGXTM BIO-RAD) in condizioni riducenti e successivamente trasferite su un

filtro di nitrocellulosa da 0,2 μ m (BIO-RAD). Le membrane sono state bloccate overnight a 4°C con latte scremato Marvel al 5% in 1xTris Buffered Saline/Tween 20 (TBST 20 mM tris HCL, pH=8, 300 mM NaCl, 0,1% Tween 20) e incubate un'ora con l'Ab primario Anti-DCAMKL1 (AbNova #640-729). Le membrane sono stati successivamente lavati con TBST e incubati un'ora con l'Ab secondario diretto contro le IgG di topo coniugati con perossidasi (Sigma #5278). Per la rivelazione è stato utilizzato il sistema di chemiluminescenza Light A Bolt Plus (Euroclon).

6.1.6. IMMUNOFLUORESCENZA (IF)

Le cellule sono state piastrate su ChamberSlide 8 Well (LABTEK #154534) a una densità di 50'000 cellule/pozzetto e sono state coltivate per 24 ore al fine di permettere l'adesione delle cellule. Successivamente le cellule sono state lavate con DPBS per allontanare il terreno e possibili residui cellulari e fissate in metanolo/acetone 1:1 per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo l'allontanamento del fissante e un lavaggio con FBS20% in DPBS, le cellule sono state bloccate *overnight* in FBS20% in DPBS. Le cellule così trattate sono state incubate con l'anticorpo primario monoclonale anti-DCLK1 (AbNova #640-729) 1:100 in soluzione FBS20% in DPBS per 2 ore al buio. In seguito sono stati effettuati 3 lavaggi in DPBS e le cellule sono state incubate con l'anticorpo secondario Goat Anti-Mouse IgG1 (Texas Red, sc-2979, Santa Cruz Biotechnology) 1:100 in soluzione FBS20% in DPBS per 1 ora al buio.

I nuclei sono stati colorati per 5 minuti con 0.2 μ g/ml di 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma Aldrich, Milan, Italy). È stato poi chiuso il vetrino con glicerolo 50% in DPBS e fissato con lo smalto.

Le cellule sono state osservate con un microscopio a fluorescenza (Leica Microsystems DM 4500 B Light and Fluorescence Microscopy; Wetzlar, Germany) equipaggiato con videocamera Jenoptik Prog Res C10 Plus (Jena, Germany).

6.1.7. COLTURE CELLULARI CON INIBITORE

Le cellule immunoselezionate per i diversi marcatori elencati precedentemente e le popolazioni non sortate sono state coltivate in multi-well 6 alla densità di 1×10^4 cellule/cm² nel loro terreno di coltura a cui è stato aggiunto l'inibitore di DCLK1 (LRRK2-IN-1, Tocris #4273) o DMSO per 72 ore. Dopo tale periodo le cellule sono state fotografate con microscopio a fluorescenza/ottico (Leica Microsystems DM 4500 B Light and Fluorescence Microscopy; Wetzlar, Germany) e sono state staccate tramite tripsina per calcolarne la vitalità e il population doubling time (PDT)

6.1.8. SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE

La vitalità cellulare è stata determinata dal saggio di esclusione del Trypan Blue (Sigma # 302643-25G) sulle popolazioni e sottopopolazioni di CCA e HT29. Il Trypan Blue è un colorante vitale in grado di colorare le cellule in apoptosi o in necrosi, ma non le cellule vitali. Tale colorante è stato usato in rapporto 1:1 v/v con la soluzione cellulare da analizzare. La conta cellulare è stata effettuata tramite l'utilizzo di FAST-READ 102 (Biosigma #BSV100); sono state contate le cellule vitali all'interno della griglia, poi si

divide per il numero di griglie in cui sono state contate le cellule e si moltiplica per 20000, si ottiene così densità cellulare per ml di sospensione cellulare.

6.1.9. POPULATION DOUBLING TIME

Il tasso proliferativo è stato analizzato sulle popolazioni e sottopopolazioni di CCA e HT29. Il *population doubling time* (PDT) è stato calcolato nella fase di crescita esponenziale tramite la seguente formula $PDT = \log_{10} 2 * \Delta T \log_{10}(N_{gd}) - \log_{10}(N_{1d})$

dove N_{gd} è il numero di cellule contate al giorno in cui l'esperimento è stato bloccato, N_{1d} è il numero di cellule contate al giorno 1 e ΔT è il numero di giorni intercorsi dalla semina al blocco dell'esperimento.

6.1.10. SAGGIO MTS

Il saggio MTS è stato impiegato per la valutazione della proliferazione cellulare. Sono state seminate 1000 cellule/pozzetto in piastra da 96 pozzetti e dopo 24 ore è stato aggiunto al terreno il farmaco o il DMSO.

I campioni sono stati analizzati dopo 72 ore dall'aggiunta del farmaco. Sono stati utilizzati per ciascun pozzetto 100µL di una miscela composta da 20µl di MTS (CellTiter 96® AQueous MTS Reagent Powder, Promega) e 80µl di terreno. Dopo circa 5 minuti di incubazione a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂, è stata effettuata una lettura a 450nm con lo spettrofotometro (marca e modello).

I risultati sono stati espressi come percentuale di cambiamento rispetto ai controlli considerati pari ad 1.

6.1.11. CURVA DOSE-RISPOSTA

La curva dose-risposta è stata utilizzata per valutare a che concentrazione di farmaco inibitore si ha l'inibizione efficace del metabolismo e conseguentemente della proliferazione cellulare. Su una piastra da 96 pozzetti sono state coltivate 1000 cellule a pozzetto con farmaco a concentrazione crescente ogni 4 pozzetti e a 72h è stata valutata, tramite saggio MTS, la minima concentrazione d'inibitore efficace.

6.1.12. METODI DI ANALISI STATISTICA

I dati sono espressi come media ± deviazione standard (DS). Le analisi statistiche sono state svolte tramite il software statistico SPSS (SPSS Inc. Chicago IL, USA). Differenze tra gruppi per la distribuzione di parametri non-normali sono state calcolate tramite U test di Mann-Whitney. Significatività statistiche era settata con un valore $p < 0,05$.

6.2. RICERCA CTC:

6.2.1. CellSearch - Veridex

L'isolamento delle CTC è stato effettuato su 20 pazienti con piattaforma CellSearch in dieci di questi e con ScreenCell in 5 pazienti; 5 pazienti sono stati esclusi dalla valutazione perché non rispettavano i criteri di inclusione nello studio.

Il CellSearch system è costituito da due componenti distinte:

- CELLSEARCH AUTOPREP strumento che permette la separazione immunomagnetica delle cellule tumorali circolanti presenti nel sangue periferico

- Celltracks ANALYZER microscopio a fluorescenza automatico che permette di analizzare le cellule isolate in maniera da permetterne la conta e l'analisi delle caratteristiche fenotipiche.

Il CellSearch circulating tumor Kit contiene un reagente per la selezione costituito da ferro-fluido e reagenti immunofluorescenti. Il reagente ferro-fluido consiste di nanoparticelle con un nucleo magnetico circondato da uno strato polimerico coperto di anticorpo rivolto verso l'antigene EpCAM per la selezione delle CTC. Dopo la selezione immunomagnetica e l'arricchimento, vengono aggiunti i reagenti fluorescenti per l'identificazione ed il conteggio delle CTC. I reagenti fluorescenti includono: anti-citocheratina (CK)-PE, per la citocheratina intracellulare, DAPI, per la colorazione del nucleo cellulare e anti-CD45-APC, specifico per i leucociti. Le cellule marcate vengono sottoposte ad un intenso campo magnetico, che ne permette la selezione, e successivamente acquisite attraverso scansione. All'operatore viene presentato, per l'interpretazione e la classificazione, ogni evento che mostra una contemporanea fluorescenza per CK-PE e DAPI. Un evento viene quindi classificato come CTC quando il suo aspetto morfologico è compatibile con quello di una cellula tumorale e mostra contemporaneamente un fenotipo EpCAM+, CK+, DAPI+ e CD45-. Per l'analisi sono stati utilizzati campioni da 7,5 ml di sangue raccolti in CellSave Preservative tubes, contenenti EDTA e un agente fissante. Generalmente i campioni devono essere mantenuti a temperatura ambiente e processati entro 96 ore.

I campioni (7.5 ml) sono stati diluiti con tampone (6.5 ml), miscelati e centrifugati a 1700 rivoluzioni/minuto per 10 minuti con il freno disattivato.

I campioni così preparati vengono processati su CellTracks AutoPrep System.

Al termine della preparazione di campioni e anticorpo, una cartuccia viene inserita in un dispositivo di presentazione delle cellule denominato MagNest, a sua volta immesso nel Cellsearch Autoprep. Il potente campo magnetico del dispositivo MagNest attrae le cellule marcate magneticamente sulla superficie della cartuccia. Prima di procedere con la scansione, le cartucce poste all'interno dei dispositivi MagNest devono essere lasciate al buio per 20 minuti ed analizzate entro 24h. Il CellTracks Analyzer II esegue automaticamente la scansione dell'intera superficie della cartuccia, acquisisce le immagini e mostra all'operatore tutti gli "eventi" in cui sia presente contemporaneamente la fluorescenza CK-PE o CK-FITC e DAPI. Le immagini vengono presentate sotto forma di galleria per la classificazione finale.

6.2.1.1. LINEE CELLULARI DI CONTROLLO E OTTIMIZZAZIONE DEI PARAMETRI

Come controllo positivo è stata selezionata una linea cellulare umana di Colangiocarcinoma CCA12. Tale linea è stata coltivata nel mezzo di coltura RPMI 1640 con aggiunta di siero fetale bovino (10%), penicillina-streptomicina (1%) a 37°C, in 5% di CO₂ e 95% di aria.

Per caratterizzare la linea cellulare CCA12 come effettivo controllo positivo, è stata eseguita l'analisi di Western blot.

Il western blot è una tecnica biochimica che permette di identificare una determinata proteina in una miscela di proteine, mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici; in generale, per facilitare il riconoscimento, la miscela di proteine viene prima

separata in base dimensioni delle stesse (o peso molecolare) utilizzando un gel di poliacrilammide. Successivamente le proteine vengono trasferite su di un supporto, che comunemente è una membrana di nitrocellulosa, e quindi si procede al riconoscimento vero e proprio della proteina mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico.

Per prima cosa, le cellule sono state lavate due volte in PBS freddo, raccolte, e dopo centrifugazione, solubilizzate in una soluzione contenente 10mM di Tris-HCl, 160 mM di NaCl, 1mM di EGTA (agente chelante simile a EDTA), acido deossicolico all' 1%, Triton all' 1%, SDS allo 0,1% e un inibitore di proteasi. Le cellule sono state lasciate a lisare in ghiaccio per 30 minuti, dopodiché sono state centrifugate a 12000 giri per 30 minuti ed è stato raccolto il supernatante. La concentrazione proteica è stata determinata con il saggio dell'acido bicinoninico. Questo saggio sfrutta il fatto che proteine e peptidi riducono gli ioni rameici a rameosi in ambiente basico. Gli ioni rameosi reagiscono poi con Acido Bicinoninico (BCA), per formare un complesso viola-porpora (1 ione rameoso chelato da 2 molecole di BCA). Il colore viene misurato alla lunghezza d'onda di 562 nm, ed è lineare con la concentrazione proteica da microgrammi fino a 2 mg/ml. Contribuiscono al colore legami peptidici, cisteina, cistina, triptofano, tirosina.

L'estratto proteico (30 microgrammi) è stato incubato a 100°C per 10 minuti e separato nelle proteine costituenti attraverso elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) 4%-12%. Successivamente le proteine sono state trasferite su una membrana di polivinilidenfluoruro (PVDF) e lasciate tutta la notte a 4°C con i seguenti anticorpi: anticorpo murino anti-pan-citocheratine (2A4), anticorpo monoclonale murino anti PDL1 (1B12), anticorpo monoclonale murino anti-IgG1 (controllo) e anticorpo monoclonale murino anti-EpCAM (C-10). Le membrane sono state lavate tre volte in TBS e TWEEN-20 allo 0,1% e lasciate in incubazione con appropriati anticorpi secondari per 1h a temperatura ambiente. Dopo 3 lavaggi, le bande immunoreattive sono state evidenziate mediante chemiluminescenza. L'anticorpo monoclonale anti-actina è servito come proteina di controllo.

Per l'ottimizzazione dei parametri, sono stati messi a punto una serie di esperimenti. Quantità definite di cellule della linea CCA12 sono state aggiunte nei campioni di sangue (7,5 ml), prelevati da volontari sani in triplice copia, per l'analisi al CellSerch. La concentrazione finale dell'anticorpo (0,06 microgrammi/mL) è stata determinata in modo da ottenere una colorazione ottimale. La linea cellulare CCA12 priva del ligando (controllo negativo) è stata processata sotto le medesime condizioni di analisi per tener conto del rumore di fondo che potrebbe essere associato al tempo di esposizione usato per l'analisi dei campioni.

6.2.2. ScreenCell

Nei cinque pazienti esaminati mediante ScreenCell, come già detto in precedenza, le cellule tumorali circolanti sono state isolate dal sangue intero periferico mediante il dispositivo ScreenCell Cyto (ScreenCell, Parigi, Francia) basato sul filtraggio secondo il protocollo del produttore. In breve, 3 ml di sangue vengono mescolati in un opportuno tampone per lisare gli eritrociti e fissare i leucociti e le cellule circolanti non ematologiche. Le cellule circolanti sono state separate mediante un filtro microporoso a membrana che consente di mantenere solo le cellule più grandi dei pori ($7.5 \pm 0.36 \mu\text{m}$) sulla membrana. Il

filtro è stato poi rilasciato su uno scivolo, colorato con ematossilina-eosina (H & E) e osservato sotto un microscopio leggero. Le cellule circolanti non-ematologiche isolate con caratteristiche di malignità sono state definite come CTC, identificate e enumerate morfologicamente secondo i criteri seguenti: dimensione nucleare maggiore o uguale a 20 μ m, elevato rapporto nucleare / citoplasmatico ($\geq 0,75$), nucleo ipercromatico denso e membrana nucleare irregolare.

Per i pazienti arruolabili il prelievo ematico per il conteggio delle CTC doveva essere stato eseguito prima dell'inizio della chemioterapia di prima linea.

Tutti i pazienti dovevano essere valutati, per quanto riguarda la risposta ai diversi trattamenti terapeutici, usando come parametro il RR (definito dalla percentuale di risposte complete e parziali), e per l'efficacia antitumorale usando come parametri principali la PFS e l'OS. La risposta completa (CR) è stata definita come la completa scomparsa di tutti i segni di malattia (tumore primario e linfonodi). La risposta parziale (PR) è stata definita come una diminuzione del volume complessivo del tumore $\geq 50\%$, senza evidenza di progressione di malattia. La stabilizzazione della malattia (SD) è stata definita come nessun cambiamento significativo nella malattia misurabile. La progressione di malattia (PD) è stata definita come un aumento della lesione misurabile $\geq 25\%$. I dati radiologici sono stati successivamente messi a confronto con i dati isto-patologici e con i valori basali di CTC.

7. RISULTATI

Abbiamo valutato in maniera retrospettiva e prospettica pazienti affetti da CCA sottoposti a resezione chirurgica radicale o a biopsia: cinquanta (n= 50) pazienti totali, di cui 23 valutabili retrospettivamente per analisi su tessuto istologico correlabili con dati clinici; sei pazienti per la caratterizzazione molecolare di CSC in vitro; e 20 pazienti in modalità prospettica con ricerca ed analisi delle cellule tumorali circolanti (CTC).

7.1. CARATTERIZZAZIONE CLINICA DELLA POPOLAZIONE DI PAZIENTI IN STUDIO E TUMORALE ISTOMORFOLOGICA IN SITU

Descrizione caratteristiche di tutti i pazienti e delle caratteristiche tumorali (Tabelle 7 e 8):

- 50 pazienti affetti da CCA: 14 pazienti affetti da iCCA: 64.3% femmine vs 35.7% maschi; 9 pazienti affetti da pCCA: 66.7% maschi vs 32.3% femmine. Range età: 25-77 anni; età mediana di 61 aa iCCA vs 67 aa pCCA); BMI medio di 27.3 (BMI Range: 19 - 42); 23 pazienti con PS 0 sec. ECOG.
- dati bio-umorali alla diagnosi: CA 19.9 medio, iCCA = 55.8 U/ml vs pCCA = 67.3 U/ml;
- 23 pazienti affetti da CCA arruolabili per la valutazione retrospettica, di cui 14 iCCA e 9 pCCA;
 - Grading secondo AJCC¹³: G1-2 = 56.5% vs G3-4 = 39.1%; iCCA: G1-2 = 50% vs G3-4 = 50%; pCCA: G1-2 = 66.7% vs G3-4 = 33.3%;

- pazienti valutabili per stadiazione clinica e patologica (TNM)¹⁰⁻¹³; pazienti arruolati 33.5% stadio III (non operabili o non rioperabili) vs 66.5% stadio IV; iCCA: 66% stadio III vs 34% stadio IV;
 - R state, prevalenza R0 nei pazienti iCCA (78.6% vs 21.4%); 0 pCCA operati;
- classificazione istologica sec. Komuta et al¹⁻⁵. 14 casi di iCCA, 50% mucinosi e 50% misti; 9 casi di p-CCA, 100% mucinosi. (Tabelle 9 e 10)

In totale, 23 pazienti sono risultati valutabili per correlazioni prognostiche in base a localizzazione anatomica (14 Intraepatici vs 9 Perilari); e classificazione istologica sec. Komuta (50% Intraepatici Mucinosi vs 50% Intraepatici Misti). Follow-up mediano 18 mesi (range 3 – 36 mesi). Solamente i pazienti affetti da iCCA sono stati valutabili per DFS e OS: DFS mediana = 11 mesi (range 4-26 mesi); OS mediana = 22.5 mesi (range 10-36 mesi); iCCA mucinosi vs iCCA misti: DFS mediana 12 mesi (range 4-26 mesi) vs 10 mesi (range 4-13 mesi); OS mediana 24 mesi (21-29 mesi) vs 12 mesi (10-36 mesi) (Figure 12 e 13). I risultati hanno dimostrato nessuna differenza statisticamente significativa in DFS ed OS, sebbene vi sia un lieve trend di un miglior outcome per la tipologia CCA-Mucinosi (Tabelle 11 e 12). Inoltre, sono state analizzate molte altre variabili di possibile implicazione prognostica, quali dati biometrici, fattori di rischio, comorbidità, caratteristiche biologiche, stadio della neoplasia e trattamenti eseguiti, attualmente non significativamente correlabili.

7.2. CARATTERIZZAZIONE CSC

7.2.1. ESPRESSIONE GENICA DI DCLK1

Nel CCA mucinoso (Figura 14) è stata osservata un'espressione di DCLK1 statisticamente significativa ($p < 0.01$; $N=3$) nelle sottopopolazioni selezionate per EpCAM+ ($4.87 \cdot 10^{-7} \pm 7.09 \cdot 10^{-8}$), CD90+ ($4.99 \cdot 10^{-6} \pm 9.08 \cdot 10^{-7}$), LGR5+ ($1.15 \cdot 10^{-5} \pm 3.23 \cdot 10^{-6}$) e CD13+ ($3.98 \cdot 10^{-6} \pm 9.23 \cdot 10^{-7}$) rispetto alla popolazione totale (*Unsorted*) ($1.35 \cdot 10^{-7} \pm 1.76 \cdot 10^{-8}$).

Nelle HT29 (Fig. 14) è stato notato che l'mRNA di DCLK1 era maggiormente espresso nelle sottopopolazioni ($p < 0.05$; $N=3$) selezionate per CD90+ ($1.45 \cdot 10^{-6} \pm 2.29 \cdot 10^{-7}$), LGR5+ ($1.14 \cdot 10^{-5} \pm 4.03 \cdot 10^{-6}$) e CD13+ ($1.45 \cdot 10^{-6} \pm 3.09 \cdot 10^{-7}$) rispetto alla popolazione totale (*Unsorted*) ($4.12 \cdot 10^{-7} \pm 2.74 \cdot 10^{-7}$).

Nel CCA misto (Fig. 14) è stato ritrovato che l'espressione di DCLK1 risulti significativamente maggiore in tutte le popolazioni immuno-selezionate rispetto alla popolazione totale (*Unsorted*) ($3.93 \cdot 10^{-8} \pm 5.46 \cdot 10^{-9}$), EpCAM+ ($6.23 \cdot 10^{-8} \pm 1.23 \cdot 10^{-8}$; $p < 0.05$; $N=3$), CD90+ ($2.95 \cdot 10^{-5} \pm 6.026 \cdot 10^{-6}$; $p < 0.05$; $N=3$), CD133+ ($4.44 \cdot 10^{-5} \pm 4.61 \cdot 10^{-6}$; $p < 0.05$; $N=3$), CD13+ ($2.51 \cdot 10^{-5} \pm 5.06 \cdot 10^{-6}$; $p < 0.05$; $N=3$), e LGR5+ ($1.69 \cdot 10^{-5} \pm 2.22 \cdot 10^{-6}$; $p < 0.05$; $N=3$).

7.2.2. ESPRESSIONE PROTEICA DI DCLK1

Per valutare l'espressione proteica di DCLK1 e la sua quantità nelle cellule analizzate, è stata utilizzata la metodica del Western Blot e i risultati sono stati normalizzati tramite l'analisi delle cellule NIH3T3. Le popolazioni analizzate sono quelle precedentemente considerate per l'analisi genetica.

Dalla lastra mostrata in Fig. 15 A si osserva che, rispetto alla popolazione *Unsorted* ($8\% \pm 0.32$), le cellule di CCA mucinoso LGR5+ presentano una espressione significativamente maggiore di DCLK1 ($15\% \pm 0.29$; $p < 0.05$; $N=3$), seguite dalla sottopopolazione selezionata per EpCAM ($13\% \pm 0.25$; $p < 0.05$; $N=3$). DCLK1 è significativamente meno espresso rispetto alle cellule *Unsorted* nella popolazione CD13+ ($5\% \pm 0.50$; $p < 0.05$; $N=3$). In tutte le popolazioni è osservabile una banda a 82kDa, rispettiva dell'isoforma più studiata in letteratura [329], e una banda a 50 kDa derivante dal clivaggio dell'isoforma a 82 kDa. Solo nelle cellule LGR5+ è visibile una banda a 18 kDa che corrisponderebbe all'isoforma nucleare forse con compiti di segnalazione [330].

Nelle cellule di CCA misto (Fig. 15) tutte le sottopopolazioni esprimono DCLK1 in maniera significativamente ($p < 0.05$) più alta rispetto alle *Unsorted* ($7.06\% \pm 0.07$): le cellule CD133+ maggiormente ($21.956\% \pm 0.19$), seguite da CD13+ ($16.89\% \pm 0.16$), LGR5+ ($14.344\% \pm 0.46$), CD90+ ($9.842\% \pm 0.14$) e EpCAM ($9.118\% \pm 0.19$).

Le HT29 (Fig. 15) mostrano significatività ($p < 0.05$; $N=3$) nella maggiore espressione di DCLK1 rispetto alle *Unsorted* ($17\% \pm 0.89$) solo nelle EpCAM+ ($22\% \pm 0.62$). DCLK1 è significativamente ipoespresso invece nelle popolazioni CD90+ ($6\% \pm 0.54$) CD133+ ($12\% \pm 0.55$) e CD13 ($12\% \pm 0.09$).

I risultati del Western Blot riguardo le CCA confermano i dati ottenuti precedentemente tramite analisi genetica. La popolazione LGR5+ delle HT29 non esprime DCLK1 più della popolazione *Unsorted*, a differenza di quanto ottenuto con i dati di RT-qPCR.

7.2.3. LOCALIZZAZIONE DI DCLK1

Per valutare la localizzazione della proteina di DCLK1 è stata utilizzata la tecnica dell'immunofluorescenza. I vetrini analizzati sono stati normalizzati tramite l'utilizzo del DAPI (fluoroforo del nucleo). (Figura 16)

Per le cellule di CCA-mucinoso sono state analizzate la popolazione *Unsorted* e la selezionata per LGR5, per quelle di CCA misto la popolazione *Unsorted* e quella CD133+, per le HT29 e per le cellule staminali isolate dall'albero biliare umano non tumorale (*hBTSC*) la popolazione intera.

I dati ottenuti confermano quanto precedentemente affermato dalla letteratura [46; 50]: DCLK1 è una proteina a sede citoplasmatica. Non è possibile apprezzare rilevanti differenze tra la fluorescenza di DCLK1 nelle cellule immuno-selezionate rispetto alla popolazione *Unsorted* in nessuno dei due CCA analizzati. Nell'ingrandimento 40x è possibile notare una sottile trama fluorescente che plausibilmente evidenzia il legame di DCLK1 a strutture citoscheletriche, specialmente microtubuli, da quanto presentato in letteratura. Essenziale è evidenziare che le cellule di CCA presentano fluorescenza per DCLK1 in più del 90% della popolazione, mentre le *hBTSC* in poco meno del 5%.

7.2.4. COLTURE CON INIBITORE E VALUTAZIONE DI VITALITÀ E PROLIFERAZIONE

Per valutare l'importanza della funzione di DCLK1 nelle cellule di CCA mucinoso, misto e di HT29, le tre linee sono state coltivate con inibitore selettivo di DCLK1, LRRK2-IN-1 per 72 ore e successivamente ne è stata valutata la vitalità e calcolato il Tempo di Duplicazione Cellulare (PDT).

Sono state piastrate 100'000 cellule a pozzetto su idonei supporti, 12 pozzetti per ogni popolazione selezionata, cioè CCA-mucinoso *Unsorted* e LGR5+, CCA-misto *Unsorted* e CD133+, HT29 *Unsorted* e LGR5+. Di queste colture, 6 pozzetti di ogni linea selezionata è stata coltivata con terreno apposito arricchito con DMSO e LRRK2-IN-1 (LRRK2-IN-1, Tocris #4273) 5 uM, mentre gli altri 6 coltivati solo con terreno e DMSO. Dopo 72 ore sono state visualizzate e fotografate le colture, staccate le cellule, contate e ne è stata valutata la vitalità tramite il saggio Trypan Blue. Successivamente è stato calcolato il PDT per valutare l'indice di proliferazione per ogni sottopopolazione.

Nelle cellule di CCA-mucinoso (Fig. 17) è visibile la riduzione della densità cellulare in entrambe le popolazioni *Unsorted* e LGR5+ trattate con inibitore (N=6). La vitalità delle CCA-mucinoso *Unsorted* è risultata significativamente ridotta rispetto alle colture non trattate ($99.02\% \pm 0.01$) nelle cellule trattate ($85.40\% \pm 0.03$; $p < 0.01$; N=6), così come nelle LGR5+ trattate ($65.53\% \pm 0.052$; $p < 0.01$; N=6) rispetto alle non trattate ($96.38\% \pm 0.03$). Il PDT delle *Unsorted* trattate è significativamente aumentato (1.93 giorni ± 1.87 ; $p < 0.01$; N=6) rispetto alle non trattate (1.73 giorni ± 0.07 ; $p < 0.01$; N=6), nelle LGR5+ trattate assume un valore negativo poiché le cellule si riducono piuttosto che proliferare (-1.33 giorni ± 0.33 ; $p < 0.01$; N=6) rispetto alle non trattate (2.09 giorni ± 0.20 ; $p < 0.01$; N=6).

Nel CCA-misto *Unsorted* si può osservare che la vitalità nella popolazione trattata con inibitore è significativamente minore ($33.01\% \pm 0.15$; $p < 0.05$; N=6) rispetto alla non trattata (98.27%), come nelle CD133+ ($78.78\% \pm 0.06$; $p < 0.05$, N=6). Il PDT delle cellule *Unsorted* risulta significativo, poiché negativo (-1.61 giorni ± 0.46 ; $p < 0.05$; N=6) rispetto alle non trattate (0.73 giorni ± 0.03 ; $p < 0.05$; N=6), e significativo è anche quello delle CD133+ (3.82 giorni ± 1.87 ; $p < 0.05$; N=6).

Le HT29 hanno mostrato una vitalità ridotta e significativa solo nelle popolazioni selezionate per LGR5 trattate ($94.18\% \pm 0.04$; $p < 0.01$; N=6) rispetto alle non trattate (99.41%). Il PDT è significativamente ridotto nelle popolazioni trattate con inibitore (*Unsorted* = 0.80 giorni ± 0.04 ; LGR5+ = 0.94 giorni ± 0.10 ; $p < 0.01$; N=6) rispetto alle non trattate (*Unsorted* = 0.60 giorni ± 0.04 ; LGR5+ = 0.56 ± 0.01).

7.2.5. VALUTAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE IN SAGGIO MTS

Tramite il saggio MTS è stata valutato la proliferazione cellulare nelle popolazioni trattate con inibitore a concentrazione 5 μ M e in quelle non trattate dopo 72 ore. Tutti i 40 valori sono stati messi in rapporto alla rispettiva sottopopolazione non trattata a cui si dà valore 1.

Le cellule di CCA-mucinoso *Unsorted* trattate (Fig. 18) mostrano una riduzione del metabolismo significativa (0.76 ± 0.13 ; $p < 0.01$; N=6), ma soprattutto le cellule di CCA-mucinoso LGR5+ (0.36 ± 0.05 ; $p < 0.01$; N=6).

Le cellule di CCA misto *Unsorted* con inibitore (Fig. 18) mostrano una riduzione significativa del metabolismo (0.82 ± 0.05 ; $p < 0.05$; N=6), ancora più alta è quella delle CD133+ (0.67 ± 0.05 ; $p < 0.05$; N=6).

Le HT29 *Unsorted* trattate (Fig. 18) riducono la propria proiliferazione significativamente (0.88 ± 0.02 ; $p < 0.01$; N=6), ancora più significativo (0.79 ± 0.02 ; $p < 0.01$; N=6).

7.2.6. VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE PER CONCENTRAZIONI CRESCENTI DI INIBITORE DI DCLK1

La curva dose-risposta è stata utilizzata per valutare la riduzione della vitalità all'aumentare della concentrazione di inibitore LRRK2-IN-1. Le cellule sono state piastrate in una Microwell 96x e ogni 4 pozzetti è stata introdotta una concentrazione di inibitore ogni volta aumentata di 2,5 μ M (da 2,5 μ M a 20 μ M).

La vitalità delle cellule trattate diversamente è stata poi rapportata alla vitalità delle cellule piastrate con solo terreno e DMSO. (N=4) Tutte le cellule hanno mostrato una riduzione della vitalità proporzionale all'aumento della concentrazione di inibitore. (Figure 19 e 20)

Più nel dettaglio le cellule di CCA-mucinoso hanno mostrato una riduzione della vitalità a concentrazioni più basse di inibitore nella sottopopolazione LGR5+ rispetto alle *Unsorted*, così come la popolazione CD133+ rispetto alla popolazione intera di CCA misto.

È stata poi calcolata la concentrazione di inibitore alla quale vi è una riduzione del 50% della vitalità cellulare (IC50) e confrontando i dati si sono ottenuti risultati interessanti circa la maggiore risposta al trattamento con inibizione nelle diverse sottopopolazioni dei due CCA e delle HT29. La sottopopolazione con IC50 minore è risultata essere la popolazione LGR5+ del CCA-mucinoso (4,51 μ M), valore paragonabile alla sottopopolazione LGR5+ delle HT29 (5,48 μ M), dato che ulteriormente sottolinea grandi analogie tra i due tumori. Meno reattive sono risultate le cellule di CCA-misto, tanto *Unsorted* (14,72 μ M) che CD133+ (9,36 μ M). (Figure 19 e 20)

7.3. Ricerca CTC: RISULTATI

Da gennaio del 2015 a luglio del 2017 sono stati sottoposti a prelievo di sangue intero, 20 pazienti con diagnosi di Colangiocarcinoma in fase avanzata, prima di iniziare una linea di terapia. Dieci pazienti, ritenuti eleggibili per il nostro studio in quanto valutabili per RR e PFS, sono stati analizzati mediante CelleSearch di Veridex; altri 5 pazienti eleggibili per lo studio, sono stati esaminati mediante ScreenCell. Due pazienti sono stati esclusi dall'analisi in quanto hanno ritirato il consenso prima dell'esecuzione della prima TC di rivalutazione; in due casi i pazienti sono stati esclusi perché avevano un prelievo basale di CTC non diagnostico ed infine un paziente è stato escluso in quanto ha cambiato centro e non è stato possibile ricostruire la sua storia. I pazienti arruolati comprendono 5 uomini e 10 donne. L'età mediana dei pazienti arruolati era di 64 anni (range: 38 - 80 anni, media: 62,7 anni), il loro ECOG PS era pari a 0 o 1 rispettivamente nel 73.3% dei casi (11 pazienti) e nel 26.7% dei casi (4 pazienti). Il sito più comune di metastatizzazione è risultato essere il fegato con un totale di 12 pazienti (80%), seguito dal polmone con 3 pazienti (20%) e dal peritoneo con 3 pazienti (20%).

I tumori erano caratterizzati nel seguente modo: 11 (73%) iCCA, 4 (27%) pCCA, 0 (0%) dCCA. Sette pazienti erano stati sottoposti a chemioterapia adiuvante (47%). L'intervento chirurgico di asportazione del tumore primitivo è stato eseguito in 6 pazienti (40%). Nei restanti casi la diagnosi è stata posta tramite agobiopsia su metastasi.

Tutti i pazienti sono stati stadiati prima del dosaggio delle CTC e prima dell'inizio della terapia con TC-Total Body. L'esecuzione di TC-PET e RM-addome è stata valutata di volta in volta secondo il sospetto clinico. In tutti i casi sono stati eseguiti test ematologici (incluso un esame emocromocitometrico completo con conta differenziale e piastrinica),

biochimici (fosfatasi alcalina, ALT e AST, bilirubina, creatinina, sodio, potassio, cloro, calcio, fosfato inorganico, proteine totali, albumina, glucosio, acido urico, azoto ureico, CEA e Ca 19-9). Ogni paziente ha eseguito inoltre visita cardiologica con ECG ed Ecocardiogramma con determinazione della frazione di eiezione ventricolare (FE).

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un trattamento chemioterapico di prima linea secondo lo schema Cisplatino – Gemcitabina e rivalutati con CTC e TC Total Body ogni tre cicli di terapia. La ricerca di CTC è stata condotta su tutti i pazienti fino al momento della prima progressione di malattia. I pazienti andati in progressione durante il trattamento di prima linea ed in buone condizioni generali (PS = 0 – 1 secondo ECOG), sono stati trattati con una seconda linea chemioterapica a base di Fluoropirimidine.

La risposta alla terapia è stata valutata radiologicamente secondo il sistema RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) con TC-TB ogni tre mesi. Assegnando ai pazienti lo stato di: CR (Complete Response); PR (Partial Response); SD (Stable Disease); PD (Progressive Disease). In caso di progressione di malattia lo schema terapeutico veniva cambiato. (Tabella 13)

7.3.1. CellSearch

Per la ricerca di CTC utilizzando la tecnica CellSearch (immunoselezione attraverso marcatori di superficie epiteliali: CD45-, EpCAM+ e citocheratine 8+, 18+) sono stati arruolati 10 pazienti (CCA1-10) affetti da CCA, di cui 3 in stadio III non operabile e 7 in stadio IV di malattia al momento della diagnosi.

Nel gruppo CellSearch abbiamo avuto i seguenti risultati con un follow up mediano di 16 mesi (Range: 3 – 18 mesi) (Tabella 14):

- un paziente donna (CCA-1), stadio III non operabile alla diagnosi, positiva per 6 CTC al T0 e assenza di CTC al T1 in corrispondenza di stabilità di malattia alla TC Total Body; mentre al T2, ha presentato 4 CTC e progressione radiologica di malattia; paziente deceduto dopo 9 mesi dall'inizio della chemioterapia.
- una paziente donna (CCA-2), stadio III non operabile alla diagnosi, con assenza di CTC al T0, ma deceduta per progressione di malattia prima di essere rivalutata radiologicamente e con CTC; paziente deceduto dopo 3 mesi dall'inizio della chemioterapia.
- un paziente uomo (CCA-3), stadio IV, positivo per 1 CTC al T0, 2 CTC al T1 con risposta parziale di malattia alla TC Total Body; 4 CTC al T2 con evidenza di stabilità radiologica di malattia; e 0 CTC al T3 con progressione di malattia alla TC; paziente deceduto dopo 12 mesi dall'inizio della chemioterapia.
- un paziente donna (CCA-4), stadio III non operabile alla diagnosi, positiva per 1 CTC al T0, nessuna CTC al T1 con risposta parziale di malattia radiologica; 1 CTC al T2 con stabilità di malattia alla TC Total body; 3 CTC al T3 con progressione radiologica di malattia; paziente deceduto dopo 15 mesi dall'inizio della chemioterapia.
- un paziente donna (CCA-5), stadio IV, 0 CTC al T0, 1 CTC al T1 con risposta parziale di malattia alla TC TB; 2 CTC al T2 con stabilità di malattia; 2 CTC al T3 con stabilità di malattia; 2 CTC al T4 con stabilità di malattia; 5 CTC al T5 con

progressione radiologica di malattia; paziente deceduto dopo 18 mesi dall'inizio della chemioterapia.

- un paziente uomo (CCA-6), stadio IV, 0 CTC al T0, T1, T2 e T3; paziente deceduto per progressione di malattia poco prima della rivalutazione al T4; paziente deceduto dopo 15 mesi dall'inizio della chemioterapia.
- un paziente uomo (CCA-7), stadio IV, 3 CTC al T0, 1 CTC al T1 con risposta parziale di malattia alla TC Total Body; 1 CTC al T2 con stabilità radiologica di malattia; 0 CTC al T3 con stabilità di malattia alla TC Total Body; 0 CTC al T4 con progressione radiologica di malattia; paziente deceduto dopo 15 mesi dall'inizio della chemioterapia.
- un paziente donna (CCA-8), stadio IV, 3 CTC al T0, 4 CTC al T1 con progressione di malattia alla TC TB; paziente deceduto dopo 6 mesi dall'inizio della chemioterapia.
- un paziente uomo (CCA9), stadio IV, con 1 CTC al T0, 2 CTC al T1 con stabilità di malattia alla TC TB; e 0 CTC al T2 con progressione radiologica di malattia seguita da decesso della paziente prima della successiva rivalutazione; paziente deceduto dopo 9 mesi dall'inizio della chemioterapia.
- un paziente donna (CCA10), stadio IV, 1 CTC al T0; 1 CTC al T1 con stabilità di malattia, 2 CTC al T2 con progressione radiologica di malattia; paziente deceduto dopo 9 mesi dall'inizio della chemioterapia.

Ad un follow up mediano di 16 mesi (Range: 3 – 18 mesi), per quanto riguarda la valutazione radiologica, abbiamo avuto i seguenti risultati:

Dopo tre mesi di terapia, al T1, sono state evidenziate 5 stabilità di malattia alla TC Total Body (50%), 3 risposte parziali (30%), e 1 progressione di malattia (10%) ed un decesso (10%) avvenuto per progressione clinica di malattia prima della rivalutazione TC e con CTC. Nessuna RC (0%) è stata evidenziata. Il RR è risultato essere pari al 30% dei pazienti.

Dopo sei mesi di terapia, al T2 (9 pazienti), abbiamo riscontrato 4 stabilità di malattia (44.4%), nessuna risposta parziale (0%), 4 progressioni di malattia alla TC (44.4%) ed 1 decesso (11.2%);

Dopo 9 mesi di terapia (7 pazienti totali), al T3, 2 stabilità di malattia (28.6%), 2 progressioni (28.6%) e tre decessi (42.8%).

Dopo 12 mesi di terapia (3 pazienti totali), al T4, 1 stabilità (13%), 1 progressione (33%) di malattia ed 1 decesso (33%).

Dopo 15 mesi di terapia, al T5, 1 progressione di malattia (10%).

Per quanto riguarda la valutazione delle CTC (Tabella 15):

Un valore basale (al T0) di CTC pari a zero è stato evidenziato in 3 pazienti (30% del totale), 1 maschio (33%) e 2 femmine (67%); l'età media è risultata essere pari a 58 anni (range: 38 - 78 anni, mediana: 60 anni). Solo 1 pazienti (33%) aveva un PS pari ad 1 mentre per gli altri 2 (67%) era pari a 0. Un paziente affetto da CCA allo stadio III non operabile (33%) e 2 pazienti allo stadio IV (67%). Il sito di metastatizzazione più frequente è risultato essere il fegato (2/3 pazienti, 67%).

Un valore basale, al T0, di 1 CTC è stato riscontrato in 4 pazienti (40% del totale), 2 uomini (50%) e due donne (50%); l'età media è risultata essere pari a 66 anni (range: 48 - 80 anni, mediana: 68 anni). Solo 1 pazienti (25%) aveva un PS pari ad 1 mentre per gli altri 3 (75%)

era pari a 0. un paziente affetto da CCA allo stadio III non operabile (25%), e 3 pazienti allo stadio IV (75%). Il sito di metastatizzazione più frequente è risultato essere il fegato (3/4 pazienti, 75%).

Al T0, tre CTC sono state riscontrate in due pazienti (20% del totale), 1 maschio (50%) ed 1 femmina (50%); età media e mediana pari a 62 anni (range: 59 – 65 anni). Entrambi PS = 0. Entrambi avevano metastasi epatiche.

Una sola paziente mostrava 6 CTC al T0; paziente di 55 anni; PS= 0; metastasi epatiche.

Al T1 (9 pazienti totali), 3 pazienti (33%) mostravano 0 CTC; 3 pazienti (33%) sono risultati positivi per 1 CTC; 2 pazienti (22%) per 2 CTC ed 1 paziente (11%) per 4 CTC.

Al T2 (8 pazienti totali), 2 pazienti (25%) con 0 CTC; 2 pazienti (25%) con 1 CTC; 2 pazienti (25%) con 2 CTC; 2 pazienti (25%) con 4 CTC.

Al T3 (4 pazienti totali), 2 pazienti (50%) con 0 CTC; 1 paziente (25%) con 2 CTC; 1 paziente (25%) con 3 CTC;

Al T4 (2 pazienti totali), 1 paziente (50%) con 0 CTC; 1 paziente (50%) con 2 CTC; Al T5, (1 paziente), 1 paziente (100%) con 5 CTC.

Per quanto riguarda la correlazione tra risposta radiologica e andamento del numero delle CTC: la PFS mediana di tutti i 10 pazienti, indipendentemente dal valore riscontrato nella ricerca delle CTC, è stata di 7.5 mesi (range: 3 – 15 mesi); la PFS media è stata di 7.2 mesi (range: 3 – 15 mesi).

Al T0, abbiamo riscontrato: 3 pazienti con 0 CTC, di questi la sopravvivenza libera da progressione di malattia mediana è stata di 9 mesi (range: 3 – 15 mesi), PFS media è stata di 8 mesi (range: 3 – 15 mesi); 7 pazienti con CTC ≥ 1 , la cui PFS mediana è stata di 6 mesi (range: 3 – 12 mesi), la PFS media è stata di 7.3 mesi (range: 3 – 12 mesi); e 3 pazienti con CTC ≥ 3 con PFS mediana di 6 mesi (range: 3 – 12 mesi).

La OS mediana di tutti i 10 pazienti, indipendentemente dal valore riscontrato nella ricerca delle CTC, è stata di 10.5 mesi (range: 3 – 18 mesi); la OS media è stata di 11.1 mesi (range: 3 – 18 mesi).

Pazienti che al T0 avevano 0 CTC (n= 3) hanno avuto una OS mediana di 15 mesi (range: 3 – 18 mesi), OS media di 12 mesi (range: 3 – 18 mesi); pazienti che al T0 avevano CTC ≥ 1 (n= 4) hanno avuto una OS mediana di 10.5 mesi (range: 9 – 15 mesi), OS media di 11.3 mesi (range: 9 – 15 mesi); pazienti che al T0 avevano CTC ≥ 3 (n= 3) hanno avuto una OS mediana di 9 mesi (range: 6 – 15 mesi), OS media di 10 mesi (range: 6 – 15 mesi).

Confrontando infine tutti e 5 i sottogruppi (pazienti con CTC pari a zero, pazienti con CTC ≥ 1 , pazienti con CTC < 3, CTC ≥ 3 e $1 < \text{CTC} \leq 3$) i valori di PFS media sono risultati essere rispettivamente: 8 mesi, 7.3 mesi, 7.7 mesi, 8 mesi e 7.5 mesi; i valori di PFS mediana sono risultati essere rispettivamente: 9 mesi, 6 mesi, 6 mesi, 6 mesi e 7.5 mesi; i valori di OS media sono risultati essere rispettivamente: 12 mesi, 11.3 mesi, 11.6 mesi, 10 mesi e 10.5 mesi; i valori di OS mediana sono risultati essere rispettivamente: 15 mesi, 10.5 mesi, 12 mesi, 9 mesi e 10.5 mesi; mentre i valori del RR sono risultati essere rispettivamente: 33%, 28.6%, 28.6%, 33% e 0%.

Tuttavia, possiamo notare come in cinque pazienti su 10 (50%), ad un aumento numerico di CTC in corso di chemioterapia di prima linea abbia corrisposto una progressione radiologica di malattia; ed anche che in 5 pazienti su 10 (50%), l'assenza o l'azzeramento del numero di CTC si sia verificato in corrispondenza del decesso del paziente. Inoltre,

abbiamo osservato una lieve differenza in sopravvivenza dei pazienti che hanno avuto la progressione radiologica di malattia in corrispondenza di un aumento di CTC rispetto al gruppo di pazienti che hanno avuto la progressione radiologica di malattia in corrispondenza dell'azzeramento di CTC (9 mesi di OS mediana in entrambi i gruppi ma 11.4 vs 8.4 mesi di OS media).

7.3.1.1. Analisi per sottogruppi

In tutti i sottogruppi di pazienti non sono state riscontrate significative correlazioni fra la presenza di CTC e altri parametri clinico-patologici come: sedi di metastasi, caratteristiche istologiche della neoplasia, il PS, l'età ed il sesso.

7.3.2. ScreenCell

Utilizzando la tecnica dello ScreenCell: EpCAM, LGR5, CD90, CD13, CD133, sono stati arruolati 5 pazienti (CCA11-15), di cui 3 allo stadio III (non operabili) e 2 allo stadio IV.

Nel gruppo ScreenCell abbiamo avuto i seguenti risultati con un follow up mediano di 9 mesi: i 5 pazienti arruolati non sono mai risultati positivi per CTC in nessuno dei prelievi effettuati (Tabella 16).

In particolare, la popolazione in studio era così composta:

- CCA11, donna, PS= 1, età 55 anni; stadio III di malattia non operabile; 0 CTC al T0, T1, T2, T3; deceduto dopo 12 mesi dall'inizio della chemioterapia di prima linea;
- CCA12, donna, PS= 1, età 64 anni; stadio IV di malattia; 0 CTC al T0, T1, T2, T3, T4; deceduto dopo 15 mesi dall'inizio della prima linea terapeutica;
- CCA13, donna, P= 0, età 44 anni; stadio IV di malattia; 0 CTC al T0, T1, T2; deceduto dopo 9 mesi dall'inizio della prima linea terapeutica;
- CCA14, uomo, PS= 0, età 73 anni; stadio III di malattia non operabile; 0 CTC al T1; deceduto dopo 6 mesi dall'inizio della prima linea terapeutica;
- CCA15, donna, PS= 0, età 77 anni; stadio IV di malattia; 0 CTC al T0, T1, T2, T3; deceduto dopo 15 mesi dall'inizio della prima linea terapeutica;

Dopo tre mesi di terapia, al T1, sono state evidenziate 2 stabilità di malattia alla TC Total Body (40%), 2 risposte parziali (40%), e 1 progressione di malattia (20%) Nessuna RC (0%) è stata evidenziata. Il RR è risultato essere pari al 40% dei pazienti.

Dopo sei mesi di terapia, al T2 (5 pazienti), abbiamo riscontrato 2 stabilità di malattia (40%), 1 risposta parziale (20%), 1 progressione di malattia alla TC (20%) ed 1 decesso (20%);

Dopo 9 mesi di terapia (4 pazienti totali), al T3, 1 stabilità di malattia (25%), 2 progressioni (50%) e 1 decesso (25%).

Dopo 12 mesi di terapia (3 pazienti totali), al T4, 0 stabilità (0%), 1 progressione (33.3%) di malattia ed 1 decesso (33.3%).

Dopo 15 mesi di terapia (2 pazienti), al T5, 2 decessi (100%).

Nessun paziente è risultato positivo per CTC mediante la tecnica ScreenCell. Tale dato è stato confermato dalla comparazione con campioni positivi a CTC con la stessa metodica di pazienti affetti da carcinoma della vescica e del polmone.

8. DISCUSSIONE

8.1. Caratterizzazione CSC

I risultati ottenuti in questo lavoro indicano che: 1) La co-espressione, genetica e proteica, di DCLK1 con differenti marcatori di pluripotenza/multipotenza differisce a seconda se si analizza il CCA misto o il CCA mucinoso, mostrando una maggiore espressione di DCLK1 nelle sottopopolazioni di CCA mucinoso selezionate per LGR5 e nelle sottopopolazioni di CCA misto selezionate per CD133; 2) DCLK1 si localizza nel citoplasma plausibilmente in associazione con i microtubuli senza differenze di localizzazione tra le popolazioni selezionate e quelle totali e viene espresso in circa il 90% della popolazione, rispetto alle hBTSC che esprimono DCLK1 in meno del 5% delle cellule; 3) l'inibizione di DCLK1 sia nelle cellule di CCA-misto, popolazione intera e CD133+, che nelle cellule di CCA-mucinoso, popolazione intera e LGR5+, tramite inibitore specifico (LRRK2-IN-1) comporta un abbassamento delle funzioni cellulari primarie (vitalità e proliferazione); 4) l'inibizione di DCLK1 tramite LRRK2-IN-1 nelle cellule di CCA ha mostrato un andamento direttamente proporzionale dose-risposta con una riduzione massima della vitalità a concentrazioni minori nelle cellule di CCA-mucinoso LGR5+ ($IC_{50}=4,51 \mu M$) .

Attualmente non esistono metodi per la diagnosi precoce del CCA e non si conoscono i marcatori delle CCA-CSC, ovvero le cellule responsabili della crescita tumorale, delle recidive e della chemioresistenza [3]. La terapia farmacologica, tramite radio-chemioterapia, è attualmente a scopo principalmente palliativo perché non ha come target le CSC [197]. L'unica terapia efficace è la resezione chirurgica, ma ha scarsa applicabilità date le numerose diagnosi tardive [3]. In questo periodo molti gruppi di ricerca stanno cercando di individuare marcatori specifici di CSC con lo scopo di formulare una terapia mirata in grado di bloccarle [335; 329]. Una nuova proteina che sembra essere espressa a bassi livelli nelle cellule staminali non tumorali e aumenta il grado di espressione nelle CSC è DCLK1 [329; 336]. In letteratura DCLK1 è stato individuato come co-marcatore nelle CSC e la sua inibizione sembra portare a una regressione del tumore o alla scomparsa di esso [337]. In questo progetto dimostriamo come i due tipi di CCA, il CCA misto e quello mucinoso [9], mostrino diversi livelli di espressione di DCLK1 con marcatori staminali (LGR5, EpCAM, CD13, CD90) e di cellule progenitrici (CD133). Tale dato, confermato sia tramite analisi di espressione genica che proteica, potrebbe essere dovuto al fatto che il CCA-misto e il CCA-mucinoso sembrano originare da cellule differenti, presenti in nicchie staminali distinte, dislocate lungo l'albero biliare adulto umano. Da tempo il nostro gruppo di ricerca ipotizza che il CCA-misto origini dalle HPC presenti nei Canali di Hering, mentre il CCA-mucinoso origini dalle hBTSC presenti nel fondo delle PBG. Come indicato in altri tumori e condizioni patologiche metaplasiche (329, 338 - 340), DCLK1 nel CCA è stato osservato avere una localizzazione citoplasmatica associata ai microtubuli, ma non è stata notata nessuna differenza di localizzazione tra le sottopopolazioni analizzate e la popolazione totale.

In molti lavori è stato osservato come l'inibizione di DCLK1 tramite siRNA [329, 341, 342] o tramite inibitore (LRRK2-IN-1) [330] comporti una riduzione della massa tumorale *in vivo* e della carcinogenesi e vitalità *in vitro*. I nostri dati dimostrano come l'inibizione del DCLK1 comporti un significativo abbassamento della vitalità e della proliferazione e nelle sottopopolazioni a maggior espressione di DCLK1, sia a livello genico che proteico,

rispetto alle popolazioni intere. Inoltre è stata osservata una maggiore sensibilità al trattamento da parte delle cellule di CCA-mucinoso LGR5+. In letteratura è stato ipotizzato un *pathway* di DCLK1 nell'HCC [343] che individua in DCLK1 un ruolo diretto su c-Myc e uno indiretto, tramite S100A9, su NFkB. Noi ipotizziamo che tale *pathway* di DCLK1 sia presente anche nel CCA, tale ipotesi è rafforzata dai dati di dose-risposta ottenuti tramite MTS, in cui maggiore è la concentrazione di inibitore utilizzato maggiore è l'effetto sulla vitalità cellulare, fino a ridurre la vitalità al di sotto del 20%.

8.2. Ricerca CTC

Le CTC sono cellule tumorali che si sono “staccate” dal tumore primario e si ritrovano “in transito” nel sangue periferico. Da sempre gli studiosi si sono posti l'obiettivo di isolare queste cellule e di utilizzarle a fini clinici. I potenziali modi in cui potrebbero essere usate le CTC sono molti e riguardano tutte le fasi della malattia neoplastica. Intuitivo è il loro ruolo come fattore prognostico negativo e molto interessante potrebbe essere il loro impiego come fattore predittivo di risposta al trattamento e nel monitoraggio della terapia. Inoltre lo studio delle CTC potrebbe dare un valido supporto nella diagnosi e nella caratterizzazione molecolare delle varie patologie oncologiche con conseguenti grandi benefici sia in termini di costi che di tempi (biopsia liquida). Tutti questi potenziali utilizzi delle CTC sono stati indagati in vari studi presenti in letteratura ma ad oggi l'unico campo di applicazione per il quale è stata dimostrata con certezza l'efficacia, risulta essere il valore prognostico del dosaggio basale delle CTC nei tumori metastatici di colon-retto, prostata e mammella.

Attualmente, il sistema più affidabile impiegato per la conta delle CTC è il CellSearch™ System, approvato dalla FDA, un metodo immunomagnetico semiautomatico che arricchisce le CTC del sangue con nanoparticelle di Ferrofluid legate agli anticorpi anti-EpCAM. In questo modo le CTC “marcate” sono pronte per essere identificate e contate grazie al Cell Tracks Analyzer (Figura 7 F). Il sistema CellSearch™ può essere standardizzato su più laboratori e può essere utilizzato per determinare l'utilità clinica delle CTC. Queste cellule sono estremamente rare in soggetti sani e pazienti con malattie non maligne, ma sono presenti in vari carcinomi metastatici con una vasta gamma di frequenze. Nel tempo ci si è accorti, però, della necessità di dover utilizzare un cut-off per le CTC nei vari tipi di tumori, che avrebbe permesso di confrontare i dati laboratoristici con lo stato clinico-strumentale della malattia neoplastica in atto. Come già detto il sistema di conteggio delle CTC “CellSearch™ System” è stato studiato e approvato, attualmente, solo per le neoplasie della mammella, della prostata e del colon-retto metastatici. Nei tumori della mammella metastatici un numero di CTC ≥ 5 correla fortemente con la progressione radiologica della malattia in donne sottoposte a chemioterapia o terapia endocrina per MBC (Metastatic Breast Cancer). Ciò è stato dimostrato dallo studio di C Liu et al, i cui risultati confermano il ruolo della conta delle CTC come fattore prognostico nell'MBC. Anche per il tumore alla prostata, il cut-off si attesta ad un valore di CTC ≥ 5 , che identifica un gruppo di pazienti a prognosi sfavorevole. Invece, per il CCR, è stato introdotto un cut-off di CTC ≥ 3 . Gli studi condotti nei pazienti con CCR metastatico hanno dimostrato un numero più basso di CTC in questo tipo di tumore rispetto a quello mammario o prostatico, sia a livello basale che durante il trattamento. Un'ipotetica

spiegazione di ciò può essere dovuta ad un differente pattern di adesione molecolare, al drenaggio portale e all'uso sistemico di farmaci anti-angiogenici come il Bevacizumab. Lo studio del 2008 di Cohen et al. [344] ha confermato che il numero di CTC prima e durante il trattamento è un indice predittivo di PFS e OS nei pazienti con CCR metastatico e fornisce informazioni sulla prognosi in aggiunta agli altri strumenti diagnostici. Il valore delle CTC, oltre che come strumento prognostico di base, è stato utilizzato in altri studi come fattore predittivo di risposta alla terapia e per il monitoraggio terapeutico nel CCR metastatico. Nello studio di Gazzaniga et al del 2013 [345], precoci cambiamenti nel conteggio delle CTC durante il trattamento, hanno definito due gruppi di pazienti, uno a prognosi favorevole e l'altro a prognosi sfavorevole. Il primo gruppo comprendeva pazienti con valori di CTC basali pari zero che si sono mantenuti tali anche in corso di terapia, o che diminuivano, passando da $CTC \geq 1$ a zero. L'altro gruppo, quello a prognosi infausta, includeva pazienti con valori di $CTC \geq 1$ che si mantenevano tali durante il trattamento, o che aumentavano da zero a $CTC \geq 1$. È stato così dimostrato che, nel CCR metastatico, la comparsa precoce di CTC durante il trattamento, indipendentemente dal loro numero, identifica un sottogruppo di pazienti con esito sfavorevole.

Per quanto riguarda i pazienti affetti da CCA, l'unico studio presente in letteratura è quello di Jang JD e colleghi pubblicato su Hepatology nel 2015 [334], in cui è dimostrata la positività per CTC, mediante tecnica CellSearch di Veridex, in solo il 17% dei pazienti su 88 arruolati; ma soprattutto, è stato evidenziato che tale positività per un conteggio di $CTC > 2$, ma ancor più con $CTC > 5$, correlasse con la prognosi di questi pazienti in termini OS.

Partendo da questi presupposti abbiamo voluto verificare, nella nostra casistica di pazienti con CCA avanzato o metastatico, l'effettiva utilità del dosaggio basale delle CTC in pazienti naive per chemioterapia di prima linea. L'obiettivo primario del nostro studio è stato dunque quello di valutare se la presenza di CTC, isolate con metodica CellSearch™ System nel sangue periferico dei nostri pazienti, si confermi un fattore prognostico negativo come riportato in letteratura e se inoltre possa predire la risposta ai vari trattamenti terapeutici di prima linea. In secondo luogo sono stati posti a confronto il cut-off standard più diffuso in altre istologie, pari ad un valore di $CTC \geq 3$, con un cut-off di $CTC \geq 1$. I parametri valutati sono stati il RR, per quel che riguarda il ruolo della conta basale delle CTC come fattore predittivo di risposta al trattamento, e la PFS e la OS, per quel che concerne il ruolo del valore basale di CTC come fattore prognostico.

Abbiamo fatto un confronto tra i pazienti che presentavano un numero di $CTC = 0$ *versus* quelli con $CTC \geq 1$. In secondo luogo abbiamo confrontato pazienti con $CTC < 3$ e $CTC \geq 3$ nel compartimento ematico.

Nel gruppo CellSearch di Veridex, i 3 pazienti su 10 totali (30% del totale) con $CTC \geq 3$ confrontati con il gruppo con $CTC < 3$ (7 pazienti) presentavano una PFS media e mediana rispettivamente di 8 mesi e 6 mesi rispetto ai 7.7 mesi e 6 mesi; per quanto riguarda la OS media e mediana, i dati ottenuti sono stati rispettivamente di 10 mesi e 9 mesi verso 11.6 mesi e 12 mesi. Ciò non ha suggerito la possibile utilità del cut-off di 3 CTC nell'individuare i pazienti a prognosi infausta; probabilmente tale risultato è dovuto alla piccola numerosità del campione. Inoltre per il RR, e quindi il significato predittivo di risposta al trattamento del valore basale delle CTC, non è stata evidenziata nessuna

differenza significativa tra i due gruppi. Data la forte sproporzione numerica tra i pazienti con CTC basali < 3 (7 pazienti, definiti a buona prognosi) e quelli con CTC ≥ 3 (3 pazienti, definiti a cattiva prognosi) abbiamo deciso di paragonare il gruppo di pazienti che presentavano un valore basale di CTC = 0 pari a zero, con il gruppo con CTC ≥ 1 ("assenza di CTC" vs. "presenza di CTC") ottenendo come risultati, rispettivamente, OS mediana di 15 mesi vs 10.5 mesi (p value non significativo); PFS mediana, 9 mesi vs 6 mesi (p value non significativo).; tuttavia, pur considerando l'assenza di significatività statistica in una casistica di numerosità ridotta, ciò suggerisce la potenziale utilità clinica del cut-off di CTC ≥ 1 .

Per quanto riguarda il RR; e quindi il significato predittivo di risposta al trattamento del valore basale delle CTC, non è stata evidenziata una differenza statisticamente significativa ma solo un trend a favore dei pazienti con CTC = 0 rispetto a quelli con CTC ≥ 1 (33% vs 28.6%).

È interessante notare come in cinque pazienti su 10 (50%), ad un aumento numerico di CTC in corso di chemioterapia di prima linea abbia corrisposto una progressione radiologica di malattia. Questo dato è in accordo con il ruolo prognostico negativo della presenza e numerosità di CTC in altri tumori solidi e anche nel CCA, come descritto sotto. Una conta completamente negativa di CTC al CellSearch potrebbe essere spiegata con una possibile transizione epitelio – mesenchimale delle CTC, esprimenti, quindi marcatori cellulari non epiteliali e dunque non visualizzabili con il Veridex.

Riguardo la popolazione analizzata mediante lo ScreenCell, possiamo solamente ipotizzare una non idoneità del principio di selezione (dimensionale) per le CTC di CCA. Sono necessari ulteriori studi con umerosità campionaria maggiore per entrambe le metodiche al fine di definire l'esatto ruolo delle CTC nella gestione clinica dei pazienti affetti da CCA.

9. CONCLUSIONI

9.1. Caratterizzazione CSC

Lo studio preclinico da noi effettuato forma la base di un progetto teso ad approfondire il ruolo di DCLK1 e a meglio delineare il profilo di marcatore di CSC a livello dei diversi CCA. La sua maggiore espressione, sia genetica che proteica, in alcune sottopopolazioni cellulari selezionate per marcatori di staminalità suggerisce che DCLK1 è un marcatore effettivo di CSC. Inoltre, le sue diverse espressioni nelle diverse sottopopolazioni di CSC tra i diversi istotipi di CCA alimenta sempre più l'ipotesi che il CCA mucinoso e il CCA misto siano totalmente due diversi tumori. Infine importante sarà riconoscere il *pathway* di segnalazione di DCLK1, considerando che la sua inibizione porta a una importante riduzione della vitalità cellulare e che quindi bloccare la sua funzione potrebbe essere un futuro target terapeutico mirato e efficace contro il CCA.

9.2. Ricerca di CTC

In conclusione, per quanto riguarda lo studio con CellSearch di Veridex, possiamo dire che il cut-off CTC ≥ 1 vs CTC = 0 potrebbe avere una sua utilità come fattore prognostico negativo. Infatti individua un gruppo di pazienti a prognosi infausta, sia in termini di trend di PFS media e mediana (7.3 e 6 mesi vs. 8 e 9 mesi), che di OS media e mediana

(11.3 e 10.5 mesi vs. 12 e 15 mesi), che di RR (28.6% vs. 33%). La ridotta numerosità campionaria potrebbe giustificare il non raggiungimento di un p value significativo. Comunque il cut-off CTC ≥ 1 si è rivelato egualmente efficace rispetto a CTC ≥ 3 sia in termini di PFS media e mediana (7.3 e 6 mesi per i pazienti con CTC ≥ 1 vs 8 e 6 mesi per i pazienti con CTC ≥ 3), che di OS media e mediana (11.3 e 10.5 mesi per i pazienti con CTC ≥ 1 vs 10 e 9 mesi per i pazienti con CTC ≥ 3), che per quel che riguarda il RR (28.6% per i pz con CTC ≥ 1 vs 3% per i pz con CTC ≥ 3).

Ulteriori studi, con un maggior numero di pazienti e con un più lungo periodo di follow-up, saranno necessari per approfondire maggiormente e possibilmente chiarire le questioni sollevate dal nostro studio. In particolare, bisognerà individuare una tecnica caratterizzata da una maggiore sensibilità che consenta di isolare un maggior numero di CTC, in un maggior numero di pazienti, alla quale combinare una caratterizzazione *in vitro* con un pannello anticorpale più specifico. La nostra proposta è quella di utilizzare marcatori cellulari di staminalità tumorale, come DCLK-1, e di transizione epitelio mesenchimale, per poter analizzare quella parte di pazienti che pur avendo una peggior prognosi risultano essere negativi per CTC individuate mediante le classiche tecniche CellSearch di Veridex.

L'utilizzo dello ScreenCell, almeno per quanto riguarda pazienti affetti da CCA, a nostro parere richiederebbe una modifica della tecnica che preveda una preselezione cellulare mediante CellSearch con l'utilizzo di tutti e 4 i canali del Veridex inserendo le CK 7,8,18,19 e DCLK-1. In seguito sottoporre i campioni ad analisi con ScreenCell® CC ed allestire così colture cellulari da CTC per poi procedere ad ulteriori sperimentazioni che prevedano l'impianto di CTC così isolate in topi immunocompromessi, sviluppando in ultima analisi un tumore sottocutaneo.

10. TABELLE

TABELLA 1

Tumore primitivo (T)

TX	Tumore primitivo non può essere valutato	T0	Nessuna evidenza del tumore primitivo	Tis	Carcinoma in situ (tumore intraduttale)
T1	Tumore solitario senza invasione vascolare*	T2a	Tumore solitario con invasione vascolare*	T2b	Tumori multipli, con o senza invasione vascolare*
T3	Tumori che perforano il peritoneo viscerale o coinvolgono le strutture epatiche locali per invasione diretta				
T4	Tumore con invasion periduttale§				

Linfonodi regionali (N)

NX	I linfonodi regionali non possono essere valutati	N0	Non metastasi ai linfonodi regionali	N1	Metastasi ai linfonodi regionali presenti#
----	---	----	--------------------------------------	----	--

Metastasi a distanza (M)

M0	Non metastasi a distanza	M1	Metastasi a distanza presenti
----	--------------------------	----	-------------------------------

Stadio anatomico/gruppi prognostici:

Stadio 0	Tis	N0	M0
Stadio I	T1	N0	M0
Stadio II	T2	N0	M0
Stadio III	T3	N0	M0
Stadio IVA	T4	N0	M0
Stadio IVB	M0 Ogni T N1	M0	
	Ogni T Ogni N M1		

Note:

*Comprende l'invasione macrovascolare (Vena porta o epatiche) e microvascolare.

§Comprende tumori con infiltrazione periduttale o con pattern di crescita misto mass-forming con crescita periduttale.

Il coinvolgimento dei linfonodi celiaci, periaortici o cavali è considerato metastasi a distanza (M1) Abbreviazioni: TNM: tumore, linfonodi metastasi

TABELLA 2

American Joint Cancer Committee/Union for International Cancer Control 7th edition TNM staging for perihilar cholangiocarcinoma

Tumore primitivo (T)c:

Tx Tumore primitivo non può essere valutato
 T0 Nessuna evidenza del tumore primitivo
 Tis Carcinoma in situ
 T1 Tumore confinato al dotto biliare, con estensione fino alla lamina muscolare o al tessuto fibroso
 T2A Tumore che supera la parete del dotto biliare invadendo il tessuto adiposo circostante
 T2B Tumore che invade il parenchima epatico adiacente
 T3 Tumore che invade unilateralmente i rami della vena porta o dell'arteria epatica
 T4 Tumore che invade il ramo portale principale o le sue diramazioni bilateralmente, o l'arteria epatica comune, o i dotti biliari di secondo ordine bilateralmente; o i dotti biliari di secondo ordine di un lato con coinvolgimento della vena porta o dell'arteria epatica controlateralmente.

Linfonodi regionali (N):

NX I linfonodi regionali non possono essere valutati
 N0 Non metastasi ai linfonodi regionali
 N1 Metastasi ai linfonodi regionali presenti (include linfonodi lungo il dotto cistico, il dotto biliare principale, arteria epatica e vena porta)
 N2 Metastasi ai linfonodi periaortici, pericavali, lungo l'arteria mesenterica superiore e/o tripode Celiaco

Metastasi a distanza (M):

M0 Non metastasi a distanza
 M1 Metastasi a distanza presenti

Stadio anatomico/gruppi prognostici:

Stadio 0	Tis	N0	M0
Stadio I	T1	N0	M0
Stadio II	T2A-B	N0	M0
Stadio IIIA	T3	N0	M0
Stadio IIIB	T1-3	N1	M0
Stadio IVA	T4	N0-1	M0
Stadio IVB	Ogni T	N2	M0
Ogni T		Ogni N	M1

TABELLA 3

**Stadiazione TNM del dCCA secondo l'American Joint Cancer Committee/Union for International Cancer
Control 7° edizione**

Tumore primitivo (T)c:

TX	Tumore primitivo non può essere valutato
T0	Nessuna evidenza del tumore primitivo
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumore confinato istologicamente al dotto biliare
T2	Tumore che supera la parete del dotto biliare
T3	Tumore che invade la colecisti, il pancreas, il duodeno o ogni organo adiacente senza coinvolgimento del tripode celiaco o dell'arteria mesenterica superiore
T4	Tumore che invade il tripode celiaco o l'arteria mesenterica superiore

Linfonodi regionali (N):

NX	I linfonodi regionali non possono essere valutati
N0	Non metastasi ai linfonodi regionali
N1	Metastasi ai linfonodi regionali presenti

Metastasi a distanza (M):

M0	Non metastasi a distanza
M1	Metastasi a distanza presenti

Stadio anatomico/gruppi prognostici:

Stadio 0	Tis	N0	M0
Stadio IA	T1	N0	M0
Stadio IB	T2	N0	M0
Stadio IIA	T3	N0	M0
Stadio IIB	T1	N1	M0
T2		N1	M0
T3		N1	M0
Stadio III	T4	Ogni N	M0
Stadio IV	Ogni T	Ogni N	M1

TABELLA 4		
Metodiche di isolamento delle CTCs		
NOME METODICA	SPECIFICITA'	SENSIBILITA'
1.Immunomagnetic separation: AdnaTest (AdnaGen), CellSearch (Veridex), MACS (Miltenyi Biotec) MagSweeper (SSM)	Buona	Bassa
2.Size-based filtration: ISET (RareCells), ScreenCell, CTC Chip (On-Q-ity)	Bassa	Bassa
3.Microchip microfluidic capture Limited Good Good Yes/no CEE Microfluids (Biocept), Herringbone-Chip (J&J), ClearCell (Clearbridge BioMedics), Geometrically Enhanced Differential Immunocapture (GEDI)	Buona	Buona
4.Density gradient centrifugation: Ficoll-Hypaque, OncoQuick (Greiner Bio One)	Bassa	Bassa
5.Dielectrophoresis filed flow fractionation: DEP-FFF (ApoCell, Silicon Biosystems)	Buona	Buona
6.No enrichment/ICC analysis: ICC-image analysis HD-CTC assay (Epic Sciences) ab-coated nanodetector in vivo (GILUPI)	Bassa	Alta

TABELLA 5 - Ricette terreni di coltura e Separation Buffer per immunoselezione

CCA	-250 ml DMEM (Gibco #41965) -250 ml DMEM/F12 (Gibco #11320), -10% siero bovino fetale (FBS) (Gibco #10270), -1% Antibiotic-Antimycotic 100X (Gibco #15240062) -1% L-Glutamine 200 mM (Gibco #25030081)
H69	-225 ml DMEM (Gibco #41965), -225 ml DMEM/F12 (Gibco #11320033), -10% siero bovino fetale (FBS) (Gibco #10270), -1% Antibiotic-Antimycotic 100X (Gibco #15240062) -1% L-Glutamine 200 mM (Gibco #25030081) -5ml Adenina (Sigma #A2786), -250 µl di Insulina (Sigma #I2643), -500 µl di T3-T stock [6ml di transferrina (Sigma #T6397 + 100µl di triiodothyronina (Sigma #T6397)], -62 µl di idrocortisone (Sigma H0888), -10ng/ml fattore di crescita epiteliale umano (EGF) (Sigma #GF313), -500 µl di Epinefrina (Sigma #E1635)
NIH3T3	- 500 ml DMEM (Gibco #41965) -10% siero bovino fetale (FBS) (Gibco #10270), -1% Antibiotic-Antimycotic 100X (Gibco #15240062) -1% L-Glutamine 200 mM (Gibco #25030081)
Separation Buffer	-10% MACS BSA stock solution (MACS #130-091-376) -90% autoMACS Rising Solution (MACS # 130-091-222)

TABELLA 6 - Sequenze Primers (5'-3') Dcl1

Dcl1	F-'CCTGGTTGCGTCTTCGTC' R-'CAACCAGGAATGTATTGGATAAGA'
------	--

TABELLA 7				
CARATTERISTICHE PAZIENTI - CCA CORRELATE				
TOTALE PAZIENTI CON SOSPETTO DI CCA VALUTATI PER IL NOSTRO STUDIO = 50 pazienti				
PAZIENTI AFFETTI DA CCA ARRUOLATI = 40 pazienti				
PAZIENTI VALUTABILI ALLO STATO ATTUALE = 23 pazienti				
		CCA – INTRAEPATICI [14 pazienti (60,8%)]	CCA – EXTRAEPATICI [9 pazienti (39,2%)]	P
ETA'				
-	RANGE ANNI	25 - 75	53 - 77	0.25
-	MEDIANA ANNI	66	67	0.84
-	MEDIA ANNI	61.4	67.4	0.25
SESSO				
-	MASCHI	5	6	1.0
-	FEMMINE	9	3	1.0
PS (SECONDO ECOG)				
-	0	14	9	1.0
-	1	0	0	1.0
-	2	0	0	1.0
-	3	0	0	1.0
FATTORI DI RISCHIO				
-	ESPOSIZIONE AD ASBESTO	0	0	1.0
-	ALCOOL (> 10 - < 30 UI/DIE)	1	0	1.0
-	ALCOOL (> 30 UI/DIE)	0	0	1.0
-	FUMO (> 10 - < 20 SIG/DIE)	0	0	1.0
-	FUMO (> 20 SIG/DIE)	0	0	1.0
-	ESTROGENO TERAPIA	0	0	1.0
-	COLECISTECOMIA	1	0	1.0
-	CALCOLI BILIARI	1	0	1.0
-	INSULINO RESISTENZA/DIABETE MELLITO	3	0	0.54
-	BMI < 30	3	0	1.0
-	BMI > 30	3	1	0.54
-	CIRROSI	0	0	1.0
-	IBD	0	0	1.0
-	HBV +	0	0	1.0
-	HCV +	0	0	1.0
-	PSC	0	0	1.0
-	NASH	0	0	1.0
-	ASH	0	0	1.0
-	EMOCROMATOSI	0	0	1.0
-	CIRROSI BILIARE SECONDARIA	0	0	1.0
-	PBC	0	0	1.0
-	AIH	0	0	1.0
TRATTAMENTI SISTEMICI				
-	CHEMIOTERAPIA NEOADIUVAnte	2	0	1.0
-	CHEMIOTERAPIA ADIUVAnte	1	0	1.0
-	CHEMIOTERAPIA PRIMA LINEA	3	0	0.54
TRATTAMENTI LOCOREGIONALI				
-	CHIRURGIA RADICALE	5	0	0.26
-	CHIRURGIA PALLIATIVA	3	0	0.54
-	CHEMIOEMBOLIZZAZIONE	1	0	1.0

TABELLA 8			
CCA - CARATTERISTICHE TUMORALI			
TOTALE PAZIENTI CON SOSPETTO DI CCA VALUTATI PER IL NOSTRO STUDIO = 50 pazienti			
PAZIENTI AFFETTI DA CCA ARRUOLATI = 40 pazienti			
PAZIENTI VALUTABILI ALLO STATO ATTUALE = 23 pazienti			
	CCA – INTRAEPATICI [14 pazienti (60.8%)]	CCA – EXTRAEPATICI [9 pazienti (39.2%)]	P
GRADO DI DIFFERENZIAZIONE			
- 1	0	0	1.0
- 2	7	6	0.67
- 3	6	3	0.67
- 4	0	0	1.0
STADIO (AJCC)			
- IA	0	0	1.0
- IB	0	1	0.23
- IIA	6	0	0.46
- IIB	0	2	0.04
- IIIA	0	0	1.0
- IIIB	0	0	1.0
- IVA	4	1	0.11
- IVB	0	0	1.0
NUMERO LESIONI			
- 1	3	4	0.37
- >1	8	3	0.38
MARCATORI TUMORALI			
- CEA > 15	2	0	1.0
- CA19.9 > 60	4	1	0.36
- AFP	0	0	1.0
PARTICOLARI ISTOLOGICI			
- INVASIONE VASCOLARE	1	2	0.54
- INVASIONE LINFATICA	1	1	1.0
- INVASIONE PERINEURALE	2	2	1.0
- COINVOLGIMENTO LINFONODALE	4	4	0.63
- DISPLASIA DEI DOTTI BILIARI	0	0	1.0
MARGINI DI RESEZIONE (R STATE)			
- R0	4	2	0.65
- R1/R2	1	3	0.26

TABELLA 9					
CARATTERISTICHE PAZIENTI - CCA CORRELATE					
PAZIENTI AFFETTI DA CCA ARRUOLATI = 40 pazienti					
PAZIENTI VALUTABILI ALLO STATO ATTUALE = 23 pazienti					
		CCA – INTRAEPATICI [n= 14 pazienti (60.8%)]			CCA – EXTRAEPATICI [n= 9 pazienti (39.2%)]
		MUCINOSI [7 (30.4%)]	MISTI [7 (30.4%)]	P	MUCINOSI [9 (39.2%)]
ETA'					
-	RANGE ANNI	50 - 73	25 - 75	0.96	53 - 77
-	MEDIANA ANNI	61.5	66	0.96	67
-	MEDIA ANNI	61.6	61.2	0.57	67.4
SESSO					
-	MASCHI	2	3	0.58	6
-	FEMMINE	5	4	0.55	3
PS (SECONDO ECOG)					
-	0	7	7	1.0	4
-	1	0	0	1.0	0
-	2	0	0	1.0	0
-	3	0	0	1.0	0
FATTORI DI RISCHIO					
-	ESPOSIZIONE AD ASBESTO	NA	NA		0
-	ALCOOL (> 10 - < 30 UI/DIE)	0	1	1.0	0
-	ALCOOL (> 30 UI/DIE)	NA	NA		0
-	FUMO (< 20 SIG/DIE)	NA	NA		0
-	FUMO (> 20 SIG/DIE)	NA	NA		0
-	ESTROGENO TERAPIA	NA	NA		0
-	COLECISTECOMIA	1	0	0.46	0
-	CALCOLI BILIARI	1	0	0.46	0
-	INSULINO RESISTENZA/DIABETE MELLITO	2	1	0.55	0
-	BMI < 30	0	3	0.19	0
-	BMI > 30	3	0	0.19	0
-	CIRROSI	0	0	1.0	0
-	IBD	0	0	1.0	0
-	HBV +	0	0	1.0	0
-	HCV +	0	0	1.0	0
-	PSC	0	0	1.0	0
-	NASH	0	0	1.0	0
-	ASH	0	0	1.0	0
-	EMOCROMATOSI	0	0	1.0	0
-	CIRROSI BILIARE SECONDARIA	0	0	1.0	0
-	PBC	0	0	1.0	0
-	AIH	0	0	1.0	0
TRATTAMENTI SISTEMICI					
-	CHEMIOTERAPIA NEOADIUVANTE	1	1	1.0	
-	CHEMIOTERAPIA ADIUVANTE	0	1	1.0	
-	CHEMIOTERAPIA DI PRIMA LINEA	2	1	0.55	
TRATTAMENTI LOCOREGIONALI					
-	CHIRURGIA RADICALE	3	2	0.59	
-	CHIRURGIA PALLIATIVA	1	2	1.0	
-	CHEMIOEMBOLIZZAZIONE	1	0	0.46	

TABELLA 10				
CCA - CARATTERISTICHE TUMORALI				
PAZIENTI AFFETTI DA CCA ARRUOLATI = 40 pazienti				
PAZIENTI VALUTABILI ALLO STATO ATTUALE = 23 pazienti				
	CCA – INTRAEPATICI [n= 14 pazienti (60.8%)]			CCA – EXTRAEPATICI [n= 9 pazienti (39.2%)]
	MUCINOSI [7 (30.4%)]	MISTI [7 (30.4%)]	P	MUCINOSI [9 (39.2%)]
GRADO DI DIFFERENZIAZIONE				
- 1	0	0	1.0	0
- 2	4	3	0.59	6
- 3	3	4	0.59	3
- 4	0	0	1.0	0
STADIO (AJCC)				
- IA				
- IB				1
- IIA	2	4	0.59	
- IIB				2
- IIIA				1
- IIIB				2
- IVA	1	3	0.55	0
- IVB				1
NUMERO LESIONI				
- 1	2	1	0.55	4
- >1	4	4	1.0	3
MARCATORI TUMORALI				
- CEA > 15	1	1	1.0	
- CA19.9 > 60	2	2	1.0	
- AFP				
PARTICOLARI ISTOLOGICI				
- INVASIONE VASCOLARE	NA	1		2
- INVASIONE LINFATICA	1	NA		1
- INVASIONE PERINEURALE	1	1	1.0	2
- COINVOLGIMENTO LINFONODALE	1	1	1.0	4
- DISPLASIA DEI DOTTI BILIARI				
MARGINI DI RESEZIONE (R STATE)				
- R0	2	2	1.0	2
- R1/R2	NA	1		3

TABELLA 11		
CCA – CORRELAZIONI PROGNOSTICHE		
	INTRAEPATICI [14 pazienti (60.8%)]	EXTRAEPATICI [9 pazienti (39.2%)]
DFS RANGE (MESI)	4 – 26	N.A.
DFS MEDIANA (MESI)	11	N.A.
OS RANGE (MESI)	10 – 36	N.A.
OS MEDIANA (MESI)	22.5	N.A.

TABELLA 12						
CCA – CORRELAZIONI PROGNOSTICHE – 23 pazienti						
	INTRAEPATICI 14 pazienti (60.8%)					EXTRAEPATICI 9 pazienti (39.2%)
	MUCINOSI	MISTI	P-value	HR	95%CI	MUCINOSI
DFS RANGE (MESI)	4 - 26	4 - 13				N.A.
DFS MEDIANA (MESI)	12	10	0.66	0.58	0.09 - 3.19	N.A.
OS RANGE (MESI)	21 - 29	10 - 36				N.A.
OS MEDIANA (MESI)	24	12	0.54	0.78	0.06 - 7.15	N.A.

Tabella 13 - Caratteristiche dei pazienti		
CARATTERISTICHE	PARAMETRI	N° PAZIENTI
ETA' PAZIENTI (ANNI)	30-50	3
	51-60	4
	61-81	8
GENERE	M	5
	F	10
PERFORMANCE STATUS (PS)	0	11
	1	4
	2	0
TERAPIA ADIUVANTE	SI	4
	NO	11
RADIO-CHEMIOTERAPIA NEOADIUVANTE	SI	2
	NO	13

TABELLA 14										
RICERCA CTC (CellSearch – Veridex) E CORRELAZIONI RADIOLOGICHE										
	CCA1 (CTC)	CCA2 (CTC)	CCA3 (CTC)	CCA4 (CTC)	CCA5 (CTC)	CCA6 (CTC)	CCA7 (CTC)	CCA8 (CTC)	CCA9 (CTC)	CCA10 (CTC)
T0	6	0	1	1	0	0	3	3	1	1
T1	0 / SM	D	2 / SM	0 / RP	1 / RP	0 / SM	1 / RP	4 / PM	2 / SM	1 / SM
T2	4 / PM		4 / SM	1 / SM	2 / SM	0 / D	1 / SM	D	0 / PM	2 / PM
T3	D		0 / PM	3 / PM	2 / SM		0 / SM		D	D
T4			D		2 / SM		0 / PM			
T5				D	5 / PM		D			
T6					D					
CCA= PAZIENTE AFFETTO DA COLANGIOCARCINOMA; CTC= CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI; T= TEMPO (OGNI TRE MESI); TC TB= TC TOTAL BODY; RC= RISPOSTA COMPLETA; RP= RISPOSTA PARZIALE; SM= STABILITA' DI MALATTIA; PM= PROGRESSIONE DI MALATTIA; D= DECEDUTO;										

TABELLA 15:						
RICERCA CTC (CellSearch – Veridex) E CORRELAZIONI PROGNOSTICHE						
PARAMETRI	N° PAZIENTI	RR%	PFS MEDIA (mesi)	PFS MEDIANA (mesi)	OS MEDIA (mesi)	OS MEDIANA (mesi)
CTC 0	3	33	8	9	12	15
CTC ≥1	7	28.6	7.3	6	11.3	10.5
CTC < 3	7	28.6	7.7	6	11.6	12
CTC ≥3	3	33	8	6	10	9
1 < CTC ≤ 3	2	0	7.5	7.5	10.5	10.5

TABELLA 16					
RICERCA CTC (Screen Cell) E CORRELAZIONI RADIOLOGICHE					
	CCA11 (CTC)	CCA12 (CTC)	CCA13 (CTC)	CCA14 (CTC)	CCA15 (CTC)
T0	0	0	0	0	0
T1	0 / RP	0 / RP	0 / SM	0 / PM	0 / SM
T2	0 / SM	0 / RP	0 / PM	D	0 / SM
T3	0 / PM	0 / SM	D		0 / PM
T4	D	0 / PM			
T5		D			D
CCA= PAZIENTE AFFETTO DA COLANGIOCARCINOMA; CTC= CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI; T= TEMPO (OGNI TRE MESI); TC TB= TC TOTAL BODY; RC= RISPOSTA COMPLETA; RP= RISPOSTA PARZIALE; SM= STABILITA' DI MALATTIA; PM= PROGRESSIONE DI MALATTIA; D= DECEDUTO;					

11. FIGURE:

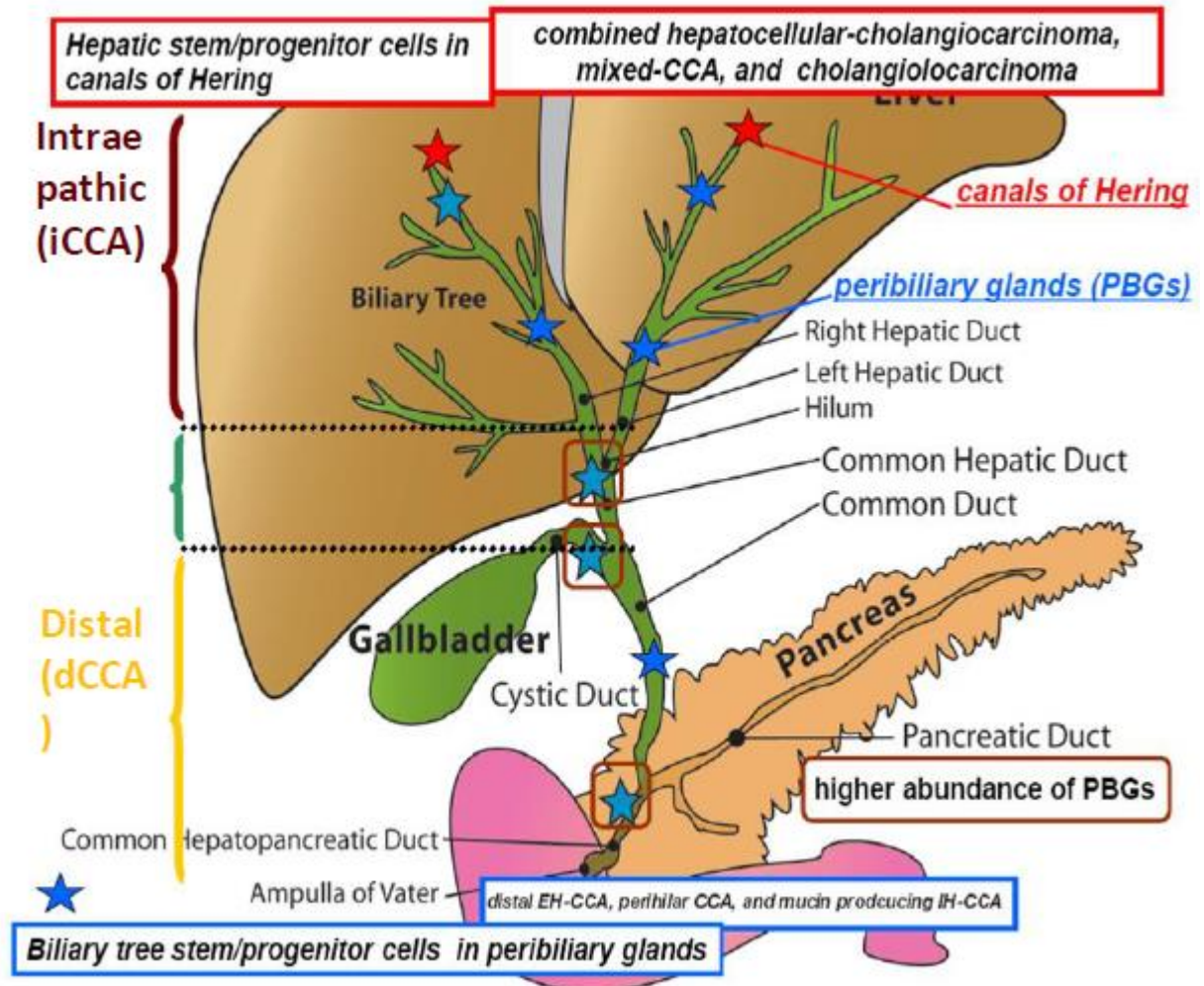


FIGURA 1: Localizzazione anatomica delle nicchie staminali del fegato

I canali di Hering (stelle rosse) intraparenchimali contengono HPC, progenitori di epatociti e colangiociti, le PBG (stelle blu), a maggiore densità ilare, contengono hBTSC, cellule di origine endodermica che si pensa rappresentino la fonte di turn-over di tutto l'albero biliare dai dotti biliari intermedi e settali-lobulari. Indicati anche i segmenti a livello dei quali si sviluppano i CCA secondo la classificazione topografica (iCCA, pCCA, dCCA).

Modificata da Cardinale et al. Hepatobiliary Surg Nutr. 2013

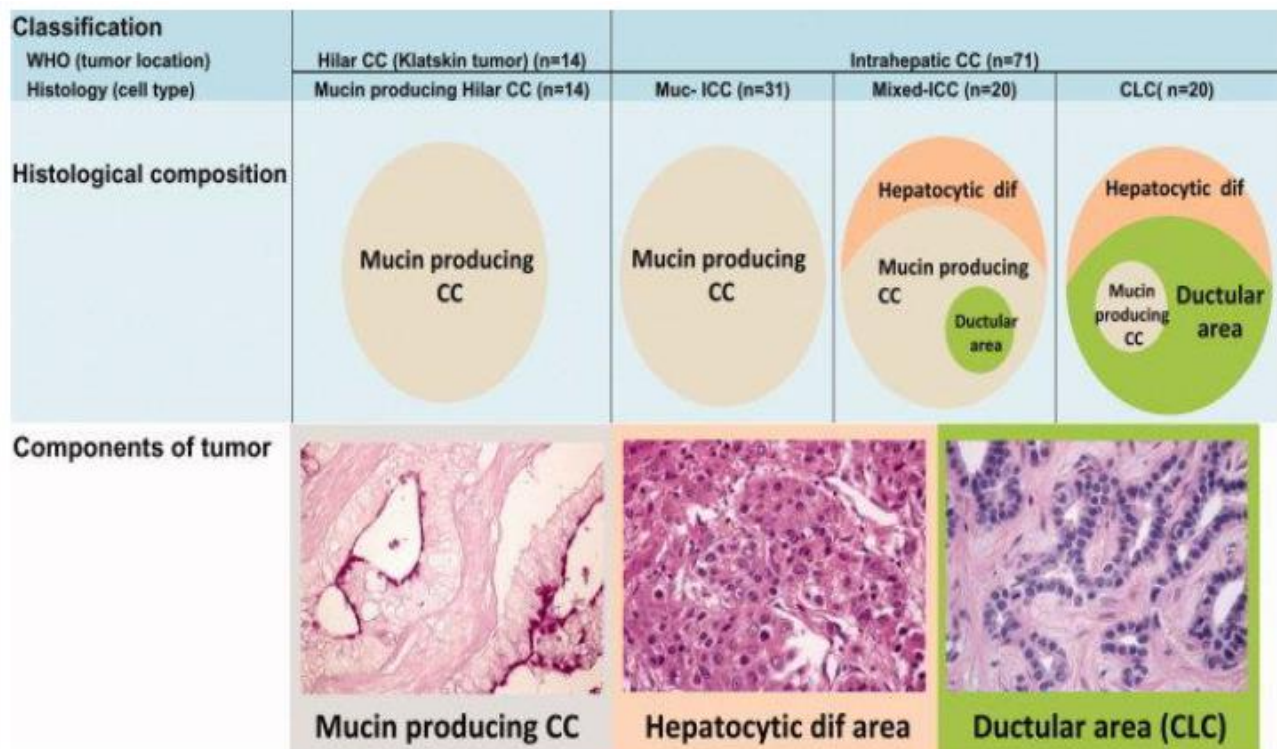


FIGURA 2: Classificazione istologica del CCA

La classificazione proposta da Komuta et al. nel 2012 identifica due tipi di CCA, mucinoso e misto. Il tipo mucinoso comprende il CCA extraepatico e quello intraepatico dei grandi dotti ed istologicamente si caratterizza per la presenza di cellule secernenti mucina; il tipo misto comprende il CCA intraepatico dei piccoli dotti ed istologicamente si caratterizza per la presenza di aree con secrezione mucipara, aree con differenziazione epatocitaria e aree con reazione duttulare.

Da Komuta et al. Hepatology. 2012

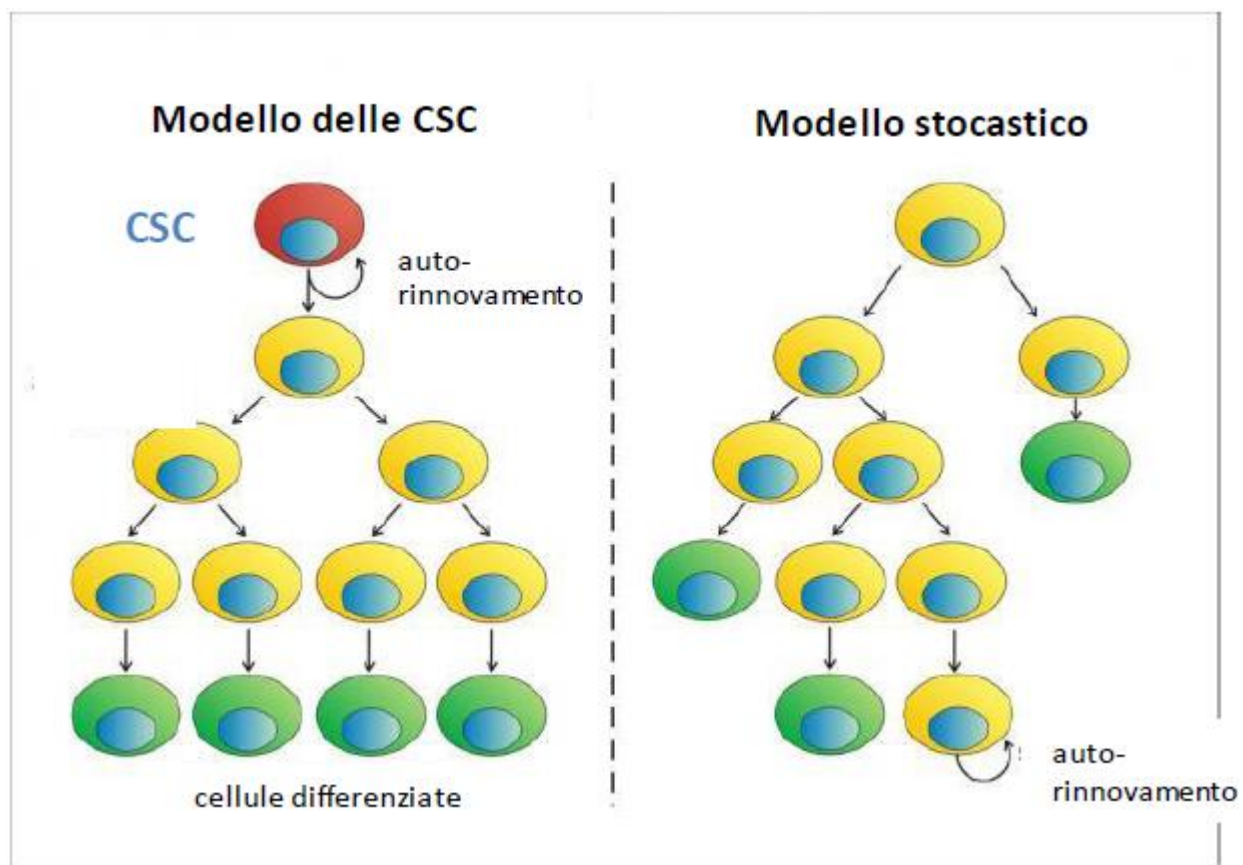


FIGURA 3: Modello stocastico e delle Cancer Stem Cells nella tumorigenesi

Il modello stocastico di cancerogenesi, per cui una cellula qualsiasi, più o meno differenziata, possa assumere una mutazione in grado di mantenere vitale un tumore è stato ormai quasi completamente abbandonato. Si contrappone a questo il modello delle CSC tramite il quale si riconosce una gerarchia tumorale, simile a quella che vige nei tessuti sani, per cui una cellula indifferenziata presenta le caratteristiche di staminalità e si differenzia nel TAC (compartimento TransAmplificante) il quale prolifera e origina il tumore vero e proprio, grazie al suo tipico alto tasso mitotico. Grande attenzione si sta ponendo recentemente verso le interazioni tra CSC e ambiente esterno.

Modificato da Maryam Rahman et al., Nature Review Cancer, 2013

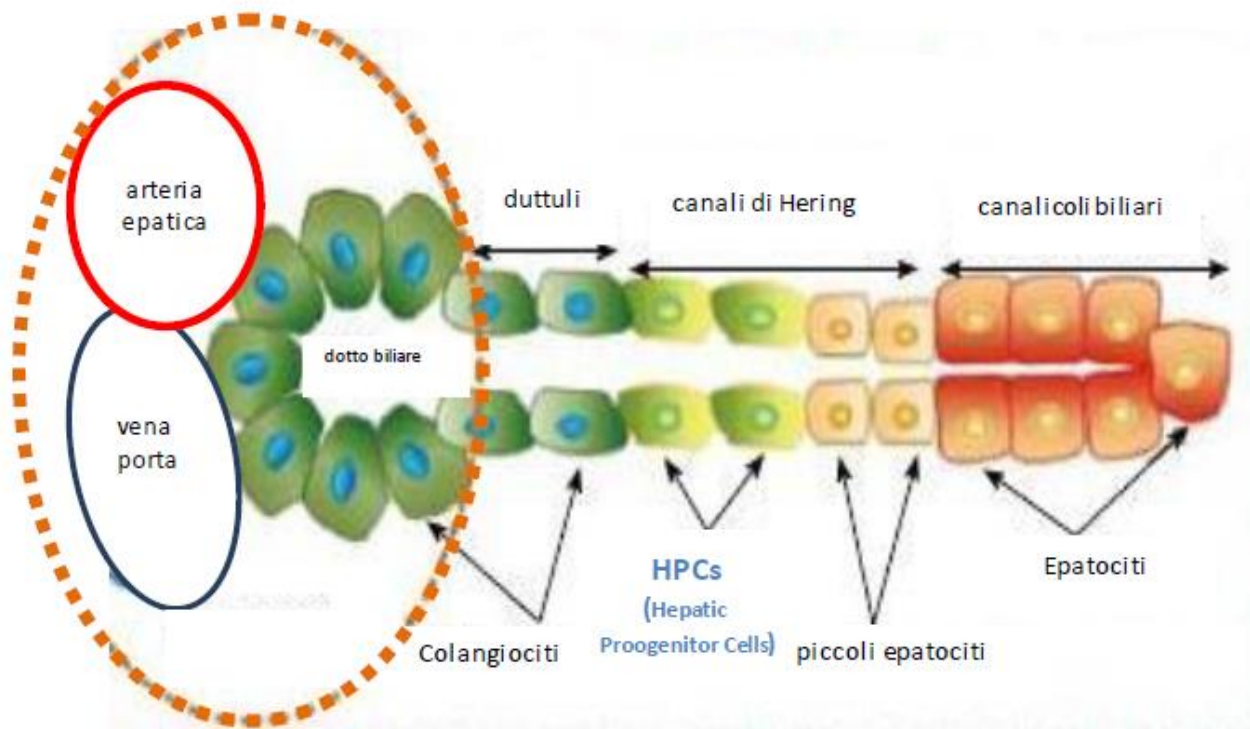


FIGURA 4: Differenziazione cellule staminali nei canali di Hering

A livello dei canali di Hering si riconoscono le HPC, cellule progenitrici in grado di differenziarsi in epatociti e formare il parenchima epatico o in colangiociti. Da queste cellule si pensa possa derivare il CCA misto, caratterizzato da popolazioni cellulari diverse a morfologia tanto epatocitaria quanto colangiocitaria.

Modificata da Lei-Bo Xu, World J Stem Cells, 2014

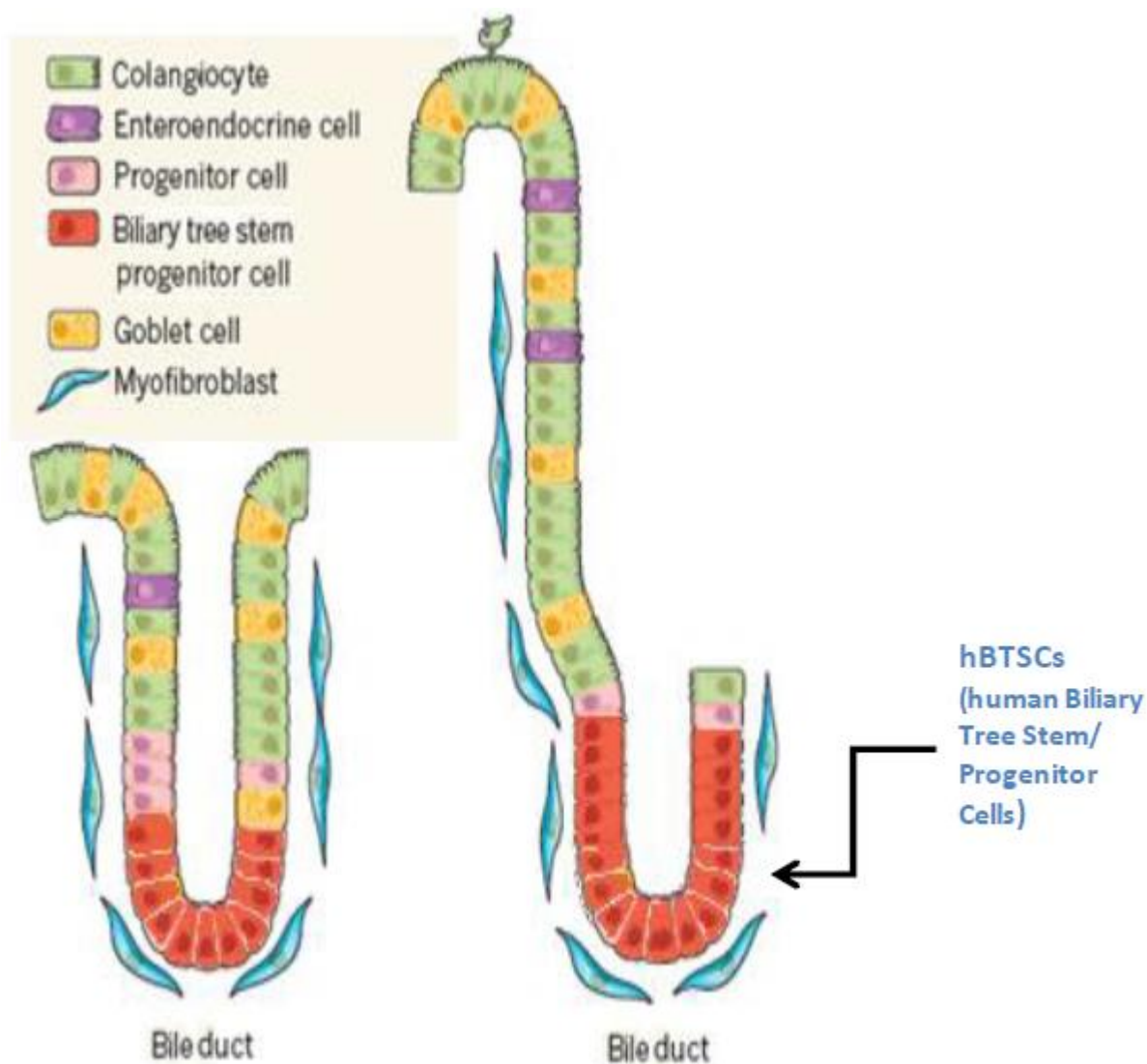


FIGURA 5: Anatomia microscopica delle PBG

Le PBG sono costituite da un epitelio monostratificato in differenziazione, caratterizzato da cellule endodermiche staminali nel fondo della ghiandola, le hBTSC (in rosso), che si differenziano in cellule progenitrici (in rosa) e successivamente maturano a livello del colletto in colangiociti (in verde).

Modificata da Cardinale et al. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2013

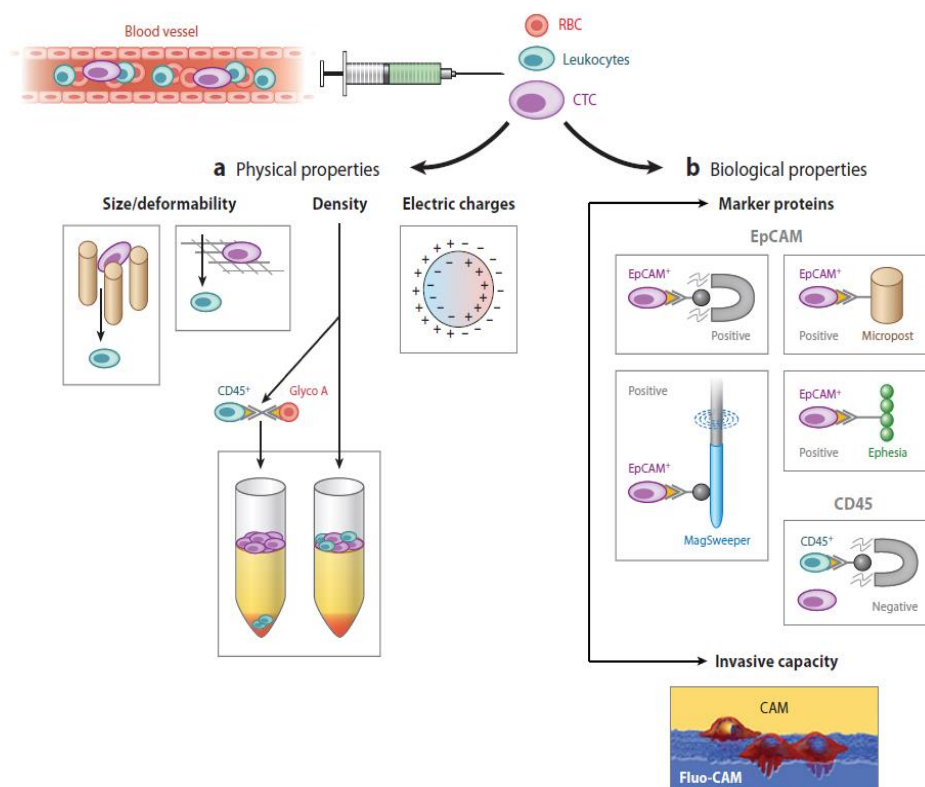


FIGURA 6:

L'arricchimento di CTCs dal sangue periferico di pazienti oncologici si basa sulle proprietà fisiche o biologiche delle CTCs. In a) le proprietà fisiche comprendono le dimensioni cellulari (dispositivi di filtraggio a membrana), la deformabilità (sistema microfluidico in un chip), la densità (sistema Ficoll) e la carica elettrica (dielettroforesi). In b) le proprietà biologiche sono espressione di marcatori di superficie e di capacità invasive. I markers di superficie comprendono le EpCAM per la selezione positiva e il CD45 per la selezione negativa; anticorpi anti-EpCAM o anti-CD45 coniugati con sferule magnetiche, sono adoperati per arricchire le CTCs immerse in un campo magnetico. ABBREVIAZIONI= glico A: glicoforina A (una proteina di 131 aminoacidi presente sulla superficie extracellulare delle cellule del sangue); CAM: matrice di adesione cellulare; fluo-CAM: matrice di adesione cellulare fluorescente; RBC: globuli rossi.

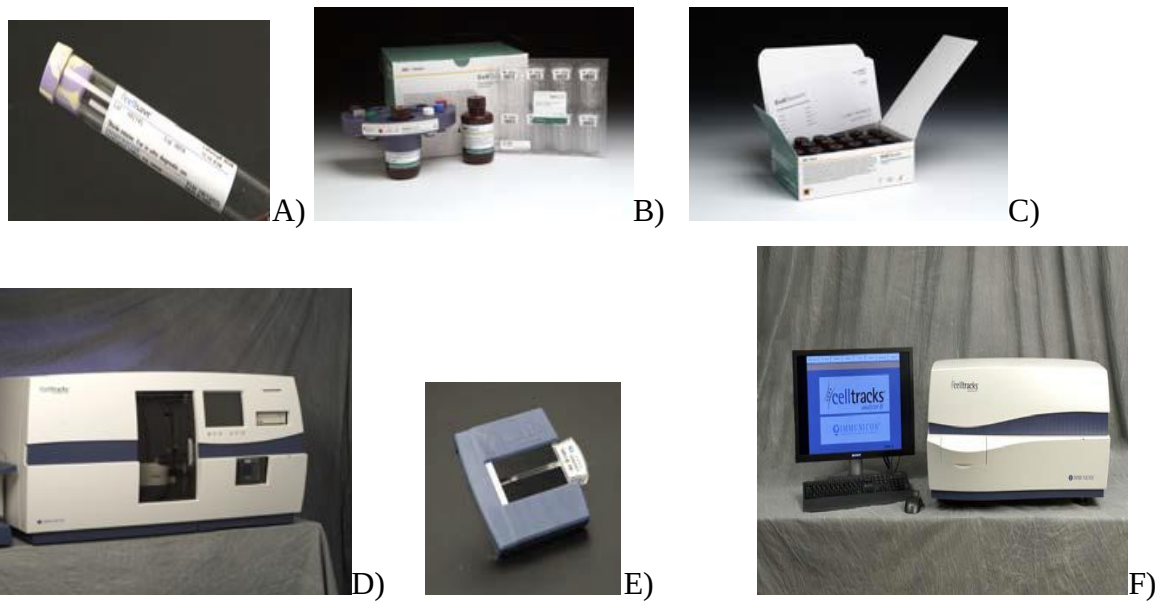


FIGURA 7: A)CellSave Tube, B) e C):CTC Kit e Control Kit del CellSearch, D)CellTracks AutoPrep System, E) MagNest, F)CellTracks Analyzer II.

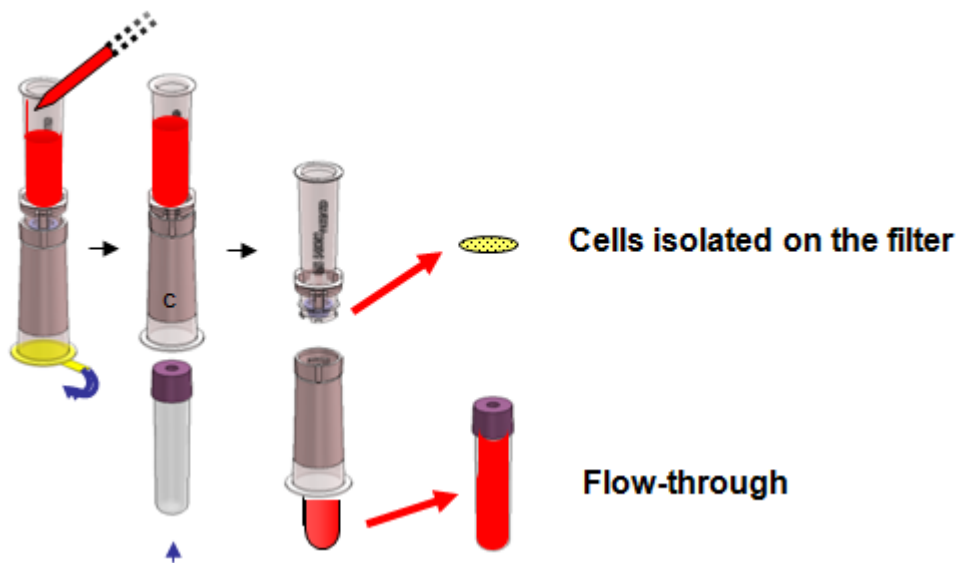


FIGURA 8: Illustrazione dell'operazione del dispositivo ScreenCell®. Il campione diluito è posto nel serbatoio del campione. Attraverso il filtro viene applicato un vuoto attraverso il fluido di trafilamento a membrana microporosa. Il filtro con le cellule acquisite viene espulso dal dispositivo per ulteriori elaborazioni.

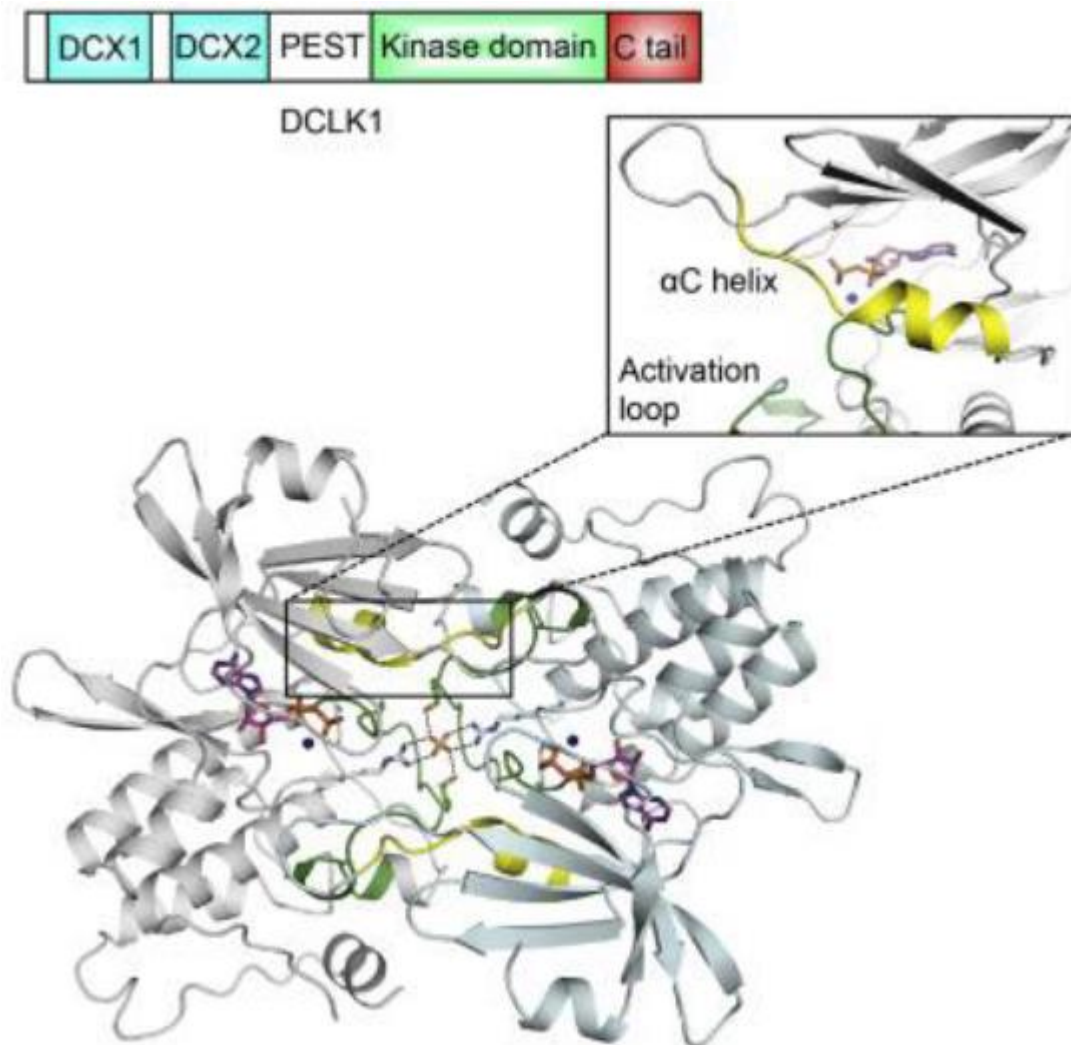


FIGURA 9: Struttura di DCLK1 a 82 kDa.

DCLK1 è una proteina della famiglia delle doublecortin ad attività chinastica di cui ancora non si conosce precisamente il ruolo. Altamente espressa a livello cerebrale e soprattutto in cellule immature, conta fino a 11 isoforme, di cui le più conosciute sono quelle a 82, 50 e 18 kDa. Mentre si pensa che la più leggera possa svolgere un ruolo nelle vie di segnalazione intranucleari, le altre isoforme condividono il dominio chinastico e sono citoplasmatiche. L'ipotesi più accreditata riconosce a DCLK1 un ruolo nel controllo dei microtubuli e forse anche nella proliferazione cellulare.

Da Onisha Patel et al., Altmetric, 2016

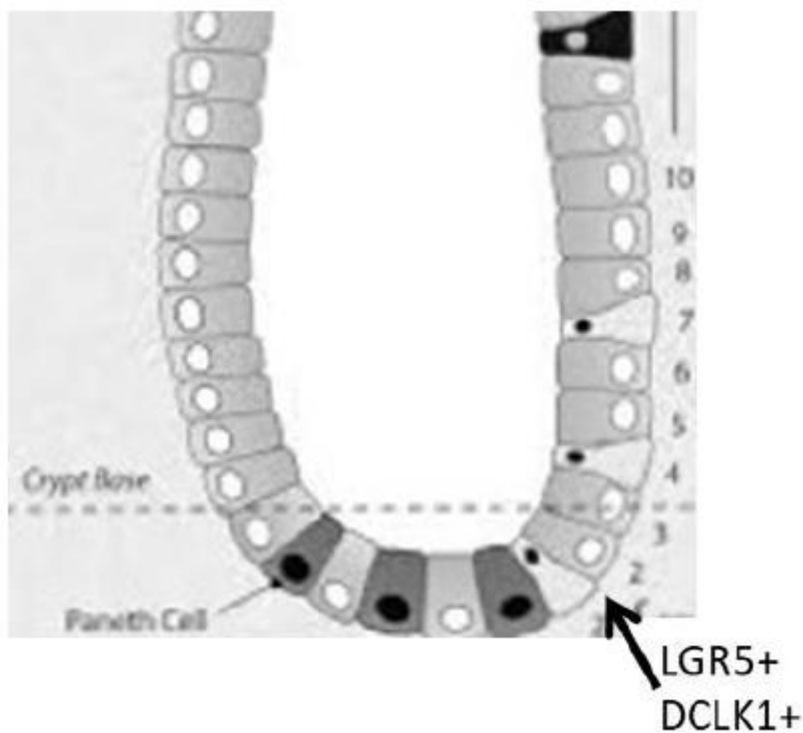


FIGURA 10: DCLK1 e LGR5 positività nelle cellule staminali delle cripte del colon.

Le cripte del colon rappresentano la fonte di cellule staminali per il turn-over dell'epitelio colico. Nel fondo risiedono cellule che si differenziano in TAC lungo la cripta e cambiano marcatura. In posizione +4 si ritrovano cellule positive per LGR5+ e DCLK1, iper-espresse nel tumore del colon retto e che si pensa possano svolgere il ruolo di CSC.

Modificato da Giuseppe Gagliardi et al., Journal of Cancer Therapeutics & Research

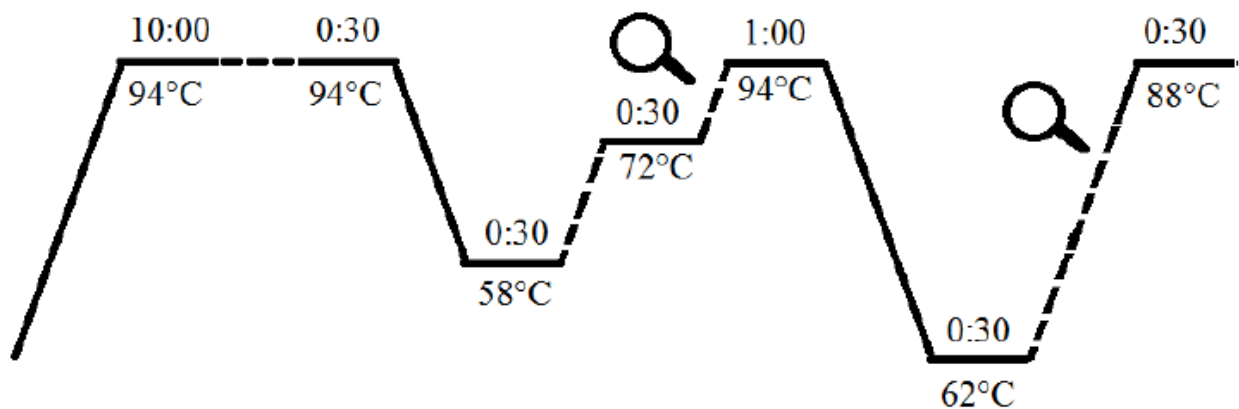


FIGURA 11: Profilo termico impostato per il macchinario di qPCR necessario alla definizione del processo di analisi dei campioni di cDNA

Il gene *Dclk1* è stato amplificato, dopo aver estratto l'RNA e averlo trasformato in cDNA, seguendo tale profilo termico, così da permettere denaturazione e amplificazione del gene stesso e valutarne la effettiva espressione genica.

FIGURA 12

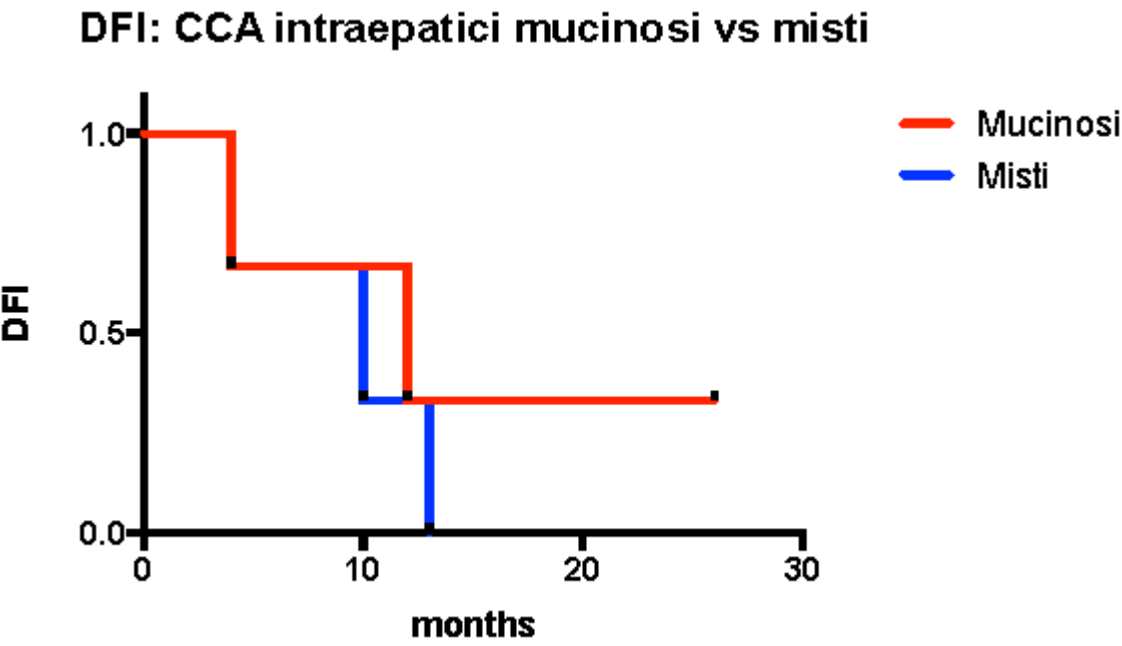
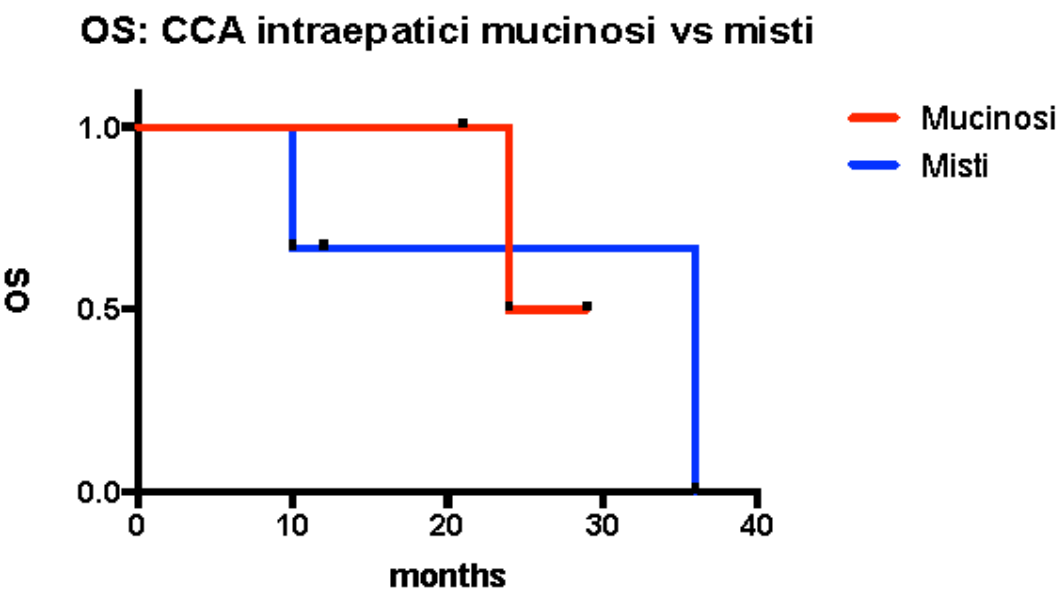


FIGURA 13



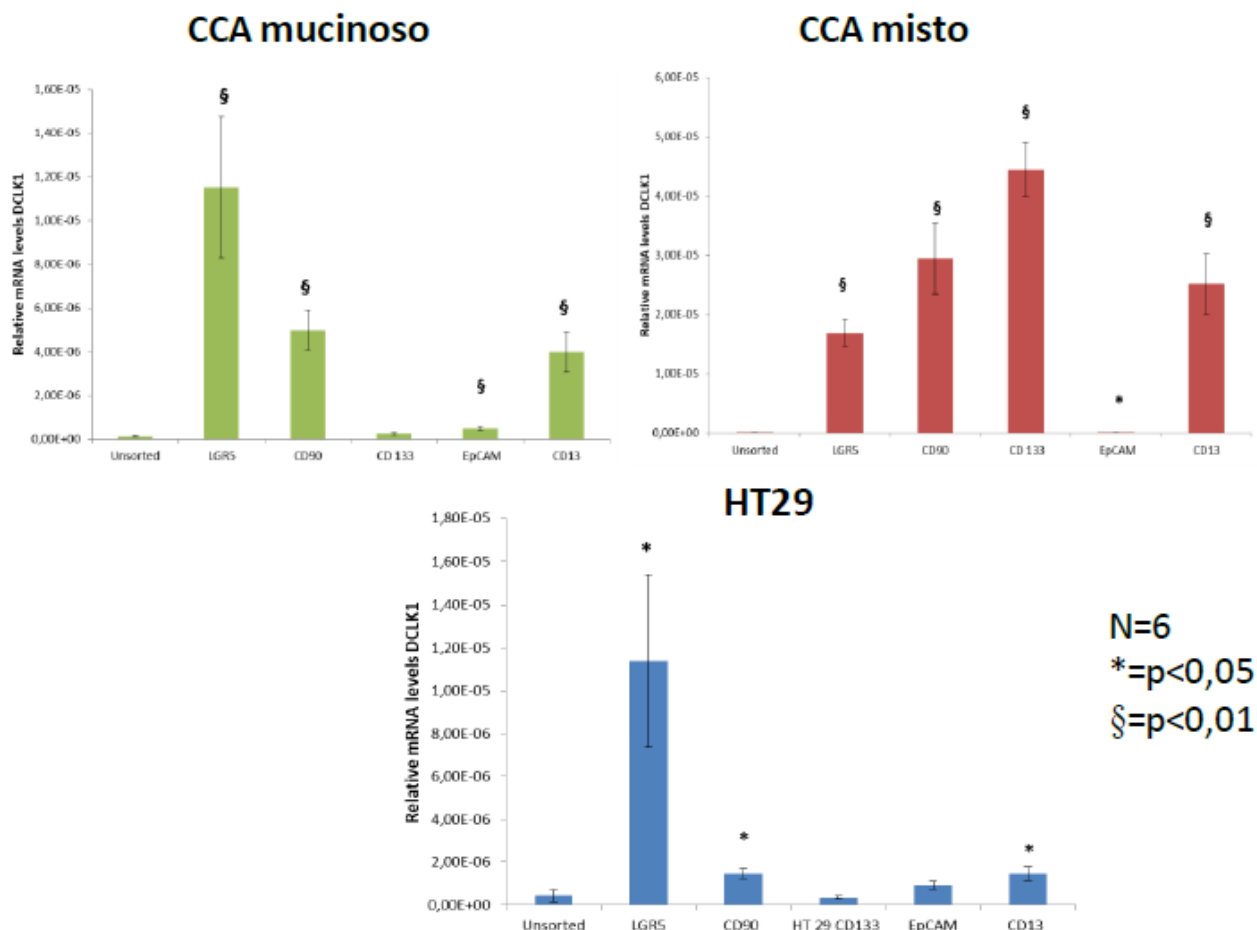


FIGURA 14: Risultati espressione genica Dclk1 in RT-qPCR confrontati tra CCA mucinose, miste e HT29

L'espressione di Dclk1 in mRNA nelle cellule di CCA misto è significativamente maggiore nella sottopopolazione sortata per CD133, seguita da CD13 e CD90 e LGR5 rispetto alle Unsorted. Nelle CCA mucinose il gene è più rappresentato nelle cellule LGR5+, ma risulta significativamente più espresso rispetto alle Unsorted anche nelle popolazioni EpCAM+, CD90 e CD13. Nelle HT29 Dclk1 è più presente nella sottopopolazione LGR5+, ma la sua espressione risulta comunque significativa rispetto alla popolazione Unsorted anche in EpCAM, CD13 e CD90.

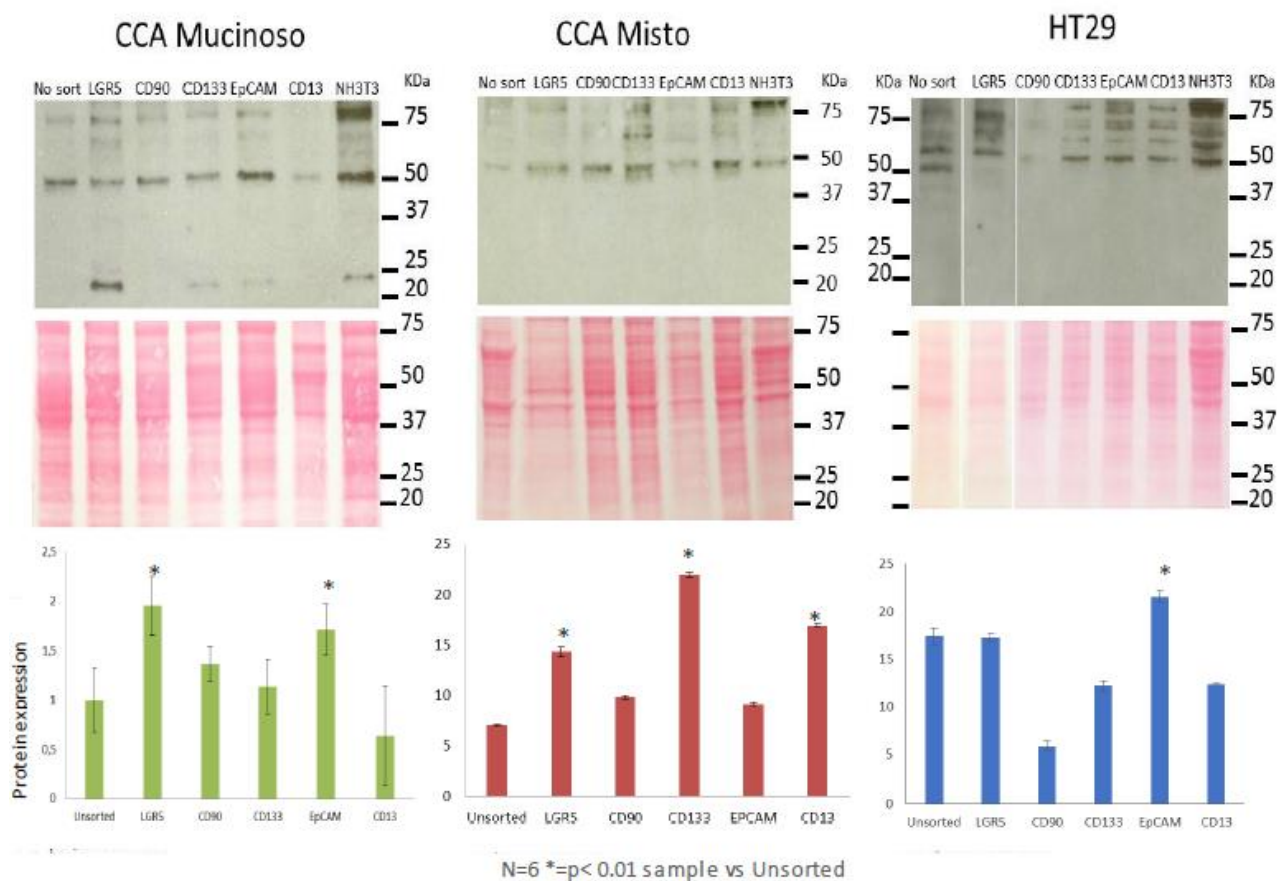
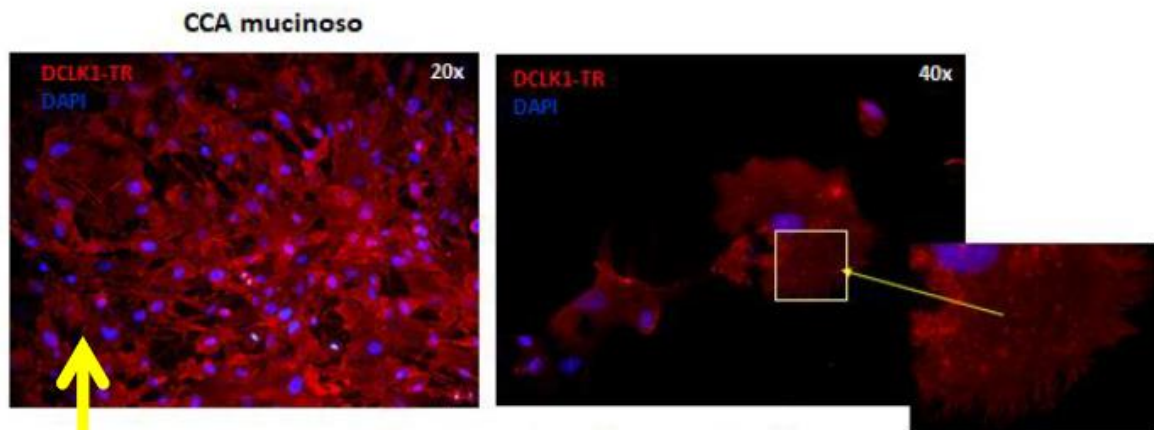


FIGURA 15: Espressione e quantizzazione proteica di DCLK1

Le cellule del lineage NIH3T3 sono state utilizzate come controllo positivo, il Rosso Ponceau è stata utilizzato per mostrare che è stata caricata sempre la stessa quantità di proteina (20 μ g), in attesa di effettuare l'housekeeping.

In A si può vedere l'espressione proteica di DCLK1 nelle CCA mucinose, maggiore nelle cellule LGR5+ e significativo anche in EpCAM+ rispetto alla popolazione Unsorted. In B si mostra come l'espressione di DCLK1 sia significativamente più alta in tutte le sottopopolazioni delle CCA miste rispetto alle cellule Unsorted, massima in CD133+. In C si può vedere come DCLK1 sia significativamente più espresso in cellule EpCAM+ rispetto alla popolazione Unsorted.

1)



2)

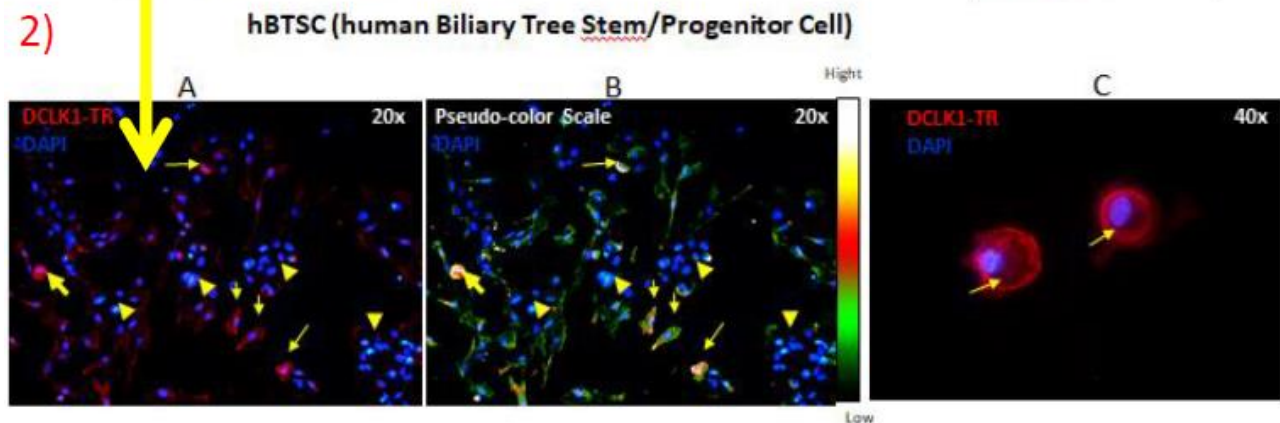


FIGURA 16: Localizzazione di DCLK1 in immunofluorescenza

Tramite l'immunofluorescenza si verifica la localizzazione di DCLK1. L'analisi è stata normalizzata con DAPI (fluoroforo nucleare).

Si può osservare che DCLK1 ha una localizzazione citoplasmatica, plausibilmente associata ai microtubuli, come già affermato in letteratura. Le cellule di CCA presentano DCLK1 in più del 90% della popolazione, a differenza delle hBTSC che lo mostrano in meno del 5%. In A si osserva la bassa presenza di Texas Red, che marca DCLK1, in B tramite la scala di Pseudo-colore si vedono le cellule che esprimono realmente DCLK1. In C un ingrandimento 40x delle cellule hBTSC positive per DCLK1.

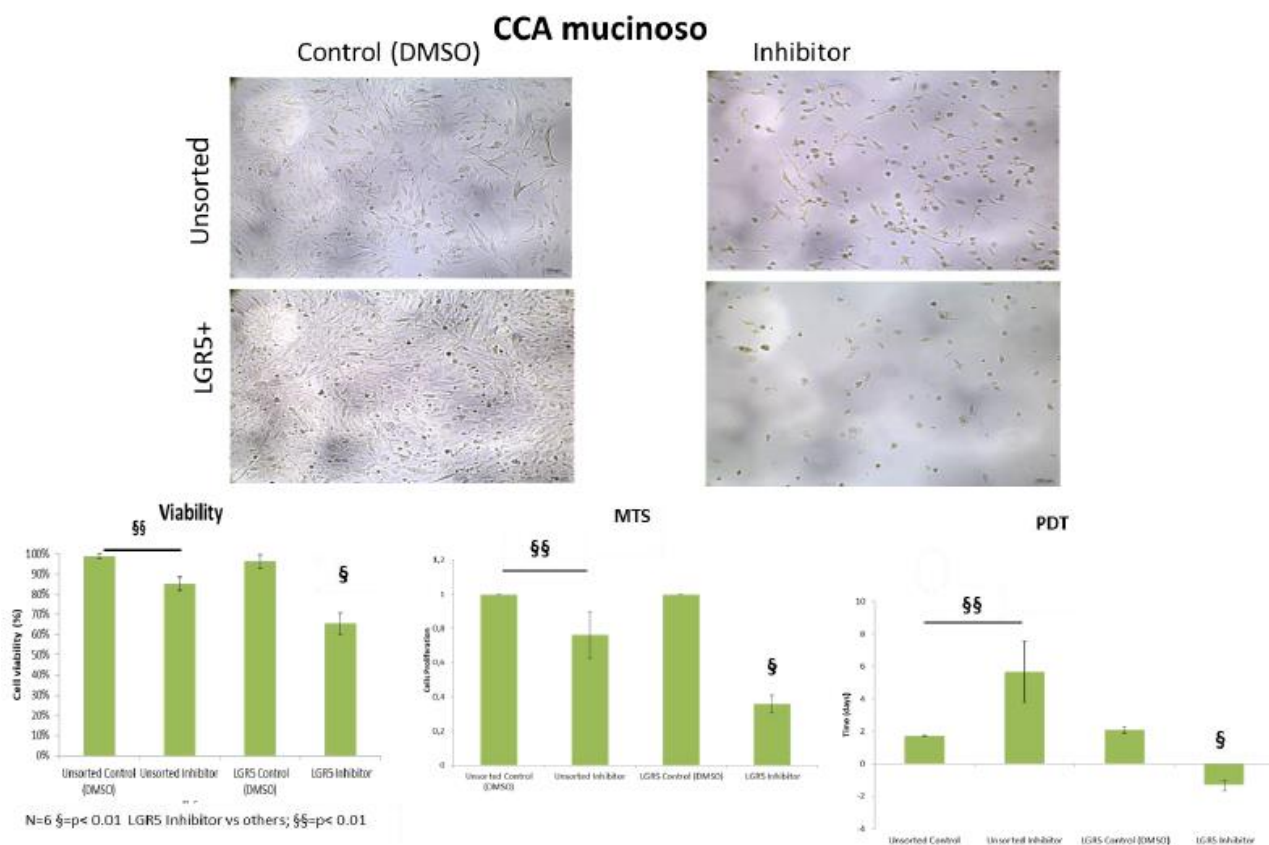


FIGURA 17: Vitalità e proliferazione del CCA mucinoso dopo coltura con inibitore specifico di DCLK1 (LRRK2-IN-1)

Le cellule di CCA mucinoso Unsorted e selezionate per LGR5 sono state fotografate dopo 72h di coltura in terreno H69 addizionato di inibitore specifico di DCLK1 in DMSO. Ugualmente sono state fotografate cellule cresciute in solo terreno+DMSO come controllo negativo. Si può notare la minore densità cellulare nelle cellule coltivate con inibitore. È stata poi valutata la vitalità cellulare e calcolato il PDT. Le cellule coltivate con LRRK2-IN-1 hanno mostrato una vitalità significativamente più bassa rispetto alle cellule prive di inibitore, tanto nella popolazione sortata, quanto nella Unsorted. La proliferazione inoltre è risultata rallentata nelle cellule con inibitore e nelle cellule Unsorted il PDT assume un valore negativo, mostrando come a 72h la popolazione non era aumentata in numero, ma diminuita. Tramite il saggio MTS è stato visto che il metabolismo cellulare della popolazione CCA mucinoso coltivate con inibitore LRRK2-N-1, sia Unsorted che selezionata per LGR5, è significativamente diminuito rispetto alle popolazioni coltivate in H69 e DMSO.

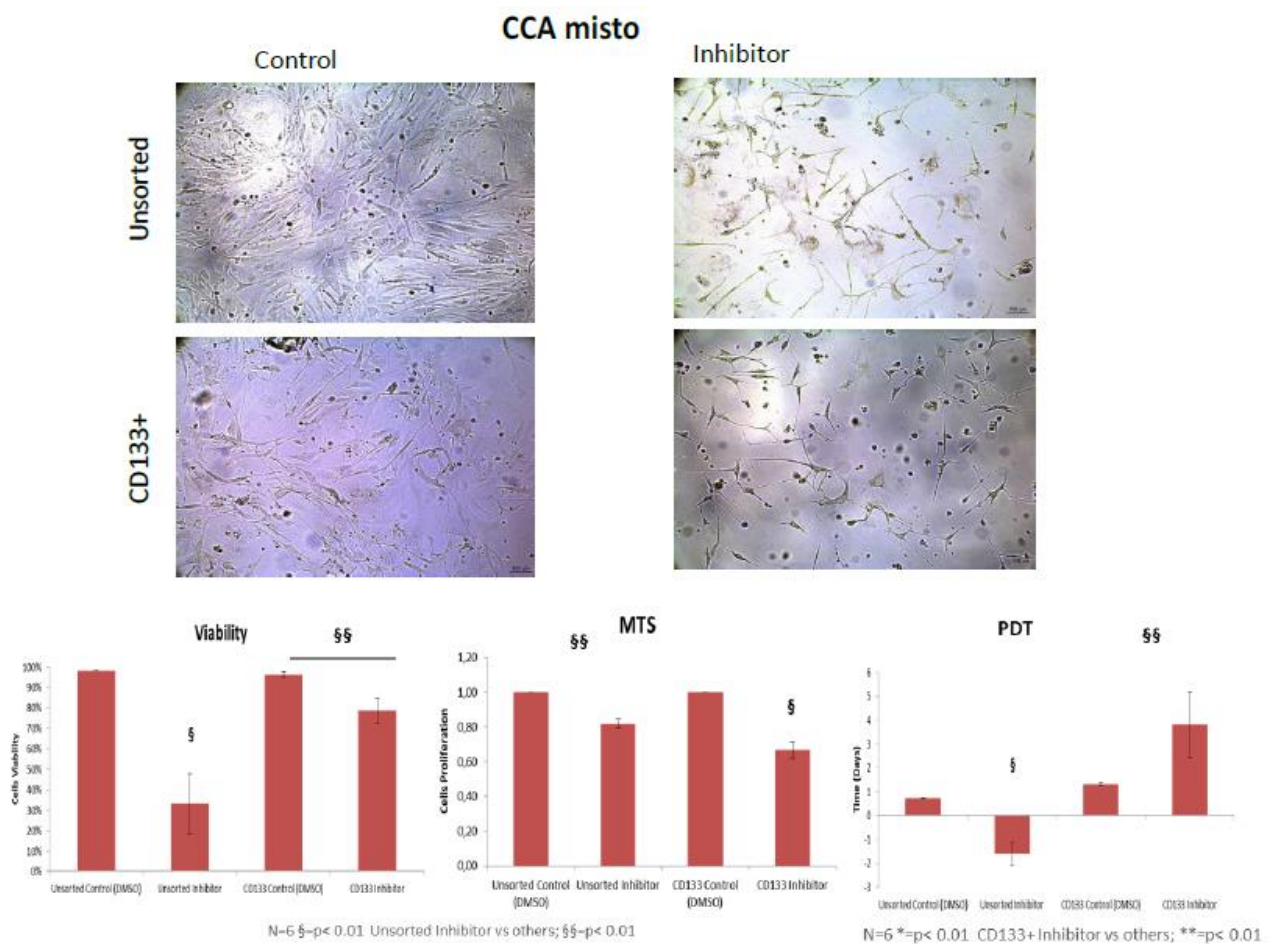


FIGURA 18: Vitalità e proliferazione del CCA misto dopo coltura con inibitore specifico di DCLK1 (LRRK2-IN-1)

Le cellule di CCA misto Unsorted e selezionate per CD133 sono state fotografate dopo 72h di coltura in terreno H69 addizionato di inibitore specifico di DCLK1 in DMSO. Ugualmente sono state fotografate cellule cresciute in solo terreno+DMSO come controllo negativo. La densità cellulare appare notevolmente minore nelle colture con inibitore. È stata poi valutata la vitalità cellulare e valutata la proliferazione tramite il PDT. Le cellule coltivate con LRRK2-IN-1 hanno mostrato una vitalità significativamente più bassa rispetto alle cellule prive di inibitore, tanto nella popolazione sortata, quanto nella Unsorted. La proliferazione è risultata rallentata nelle cellule con inibitore, nelle cellule Unsorted il PDT assume addirittura un valore negativo, mostrando come a 72h la popolazione non era aumentata in numero, ma diminuita.

Nelle CCA miste il metabolismo cellulare della popolazione coltivata con inibitore LRRK2-N-1, sia Unsorted che selezionata per CD133, è significativamente diminuito rispetto alle popolazioni coltivate in H69 e DMSO.

HT29

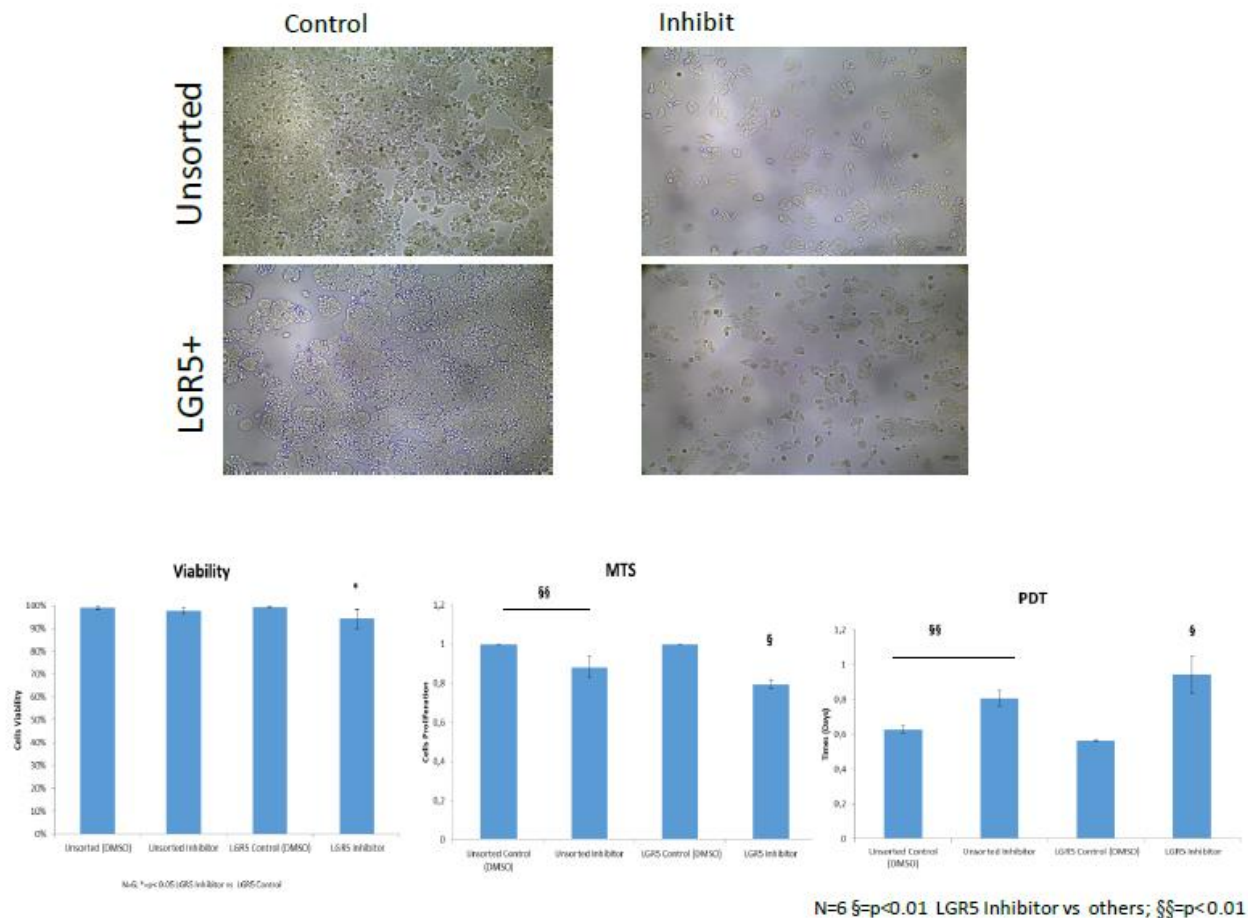


FIGURA 19: Vitalità e proliferazione delle HT29 dopo coltura con inibitore specifico di DCLK1 (LRRK2-IN-1)

Le cellule di HT29 Unsorted e selezionate per LGR5 sono state fotografate dopo 72h di coltura in terreno CCA addizionato di inibitore specifico di DCLK1 in DMSO. Ugualmente sono state fotografate cellule cresciute in solo terreno+DMSO come controllo negativo. La densità cellulare appare minore nelle colture con inibitore. È stata poi valutata la vitalità cellulare e calcolato il PDT. Le cellule coltivate con LRRK2-IN-1 hanno mostrato una vitalità significativamente più bassa rispetto alle cellule prive di inibitore solo nella popolazione LGR5+, mentre non risulta significativa nella Unsorted. Il PDT è risultato significativamente più alto nelle due popolazioni coltivate con inibitore.

Le HT29 mostrano anch'esse una significativa riduzione del metabolismo cellulare in entrambe le popolazioni trattate con inibitore, rispetto alle non trattate.

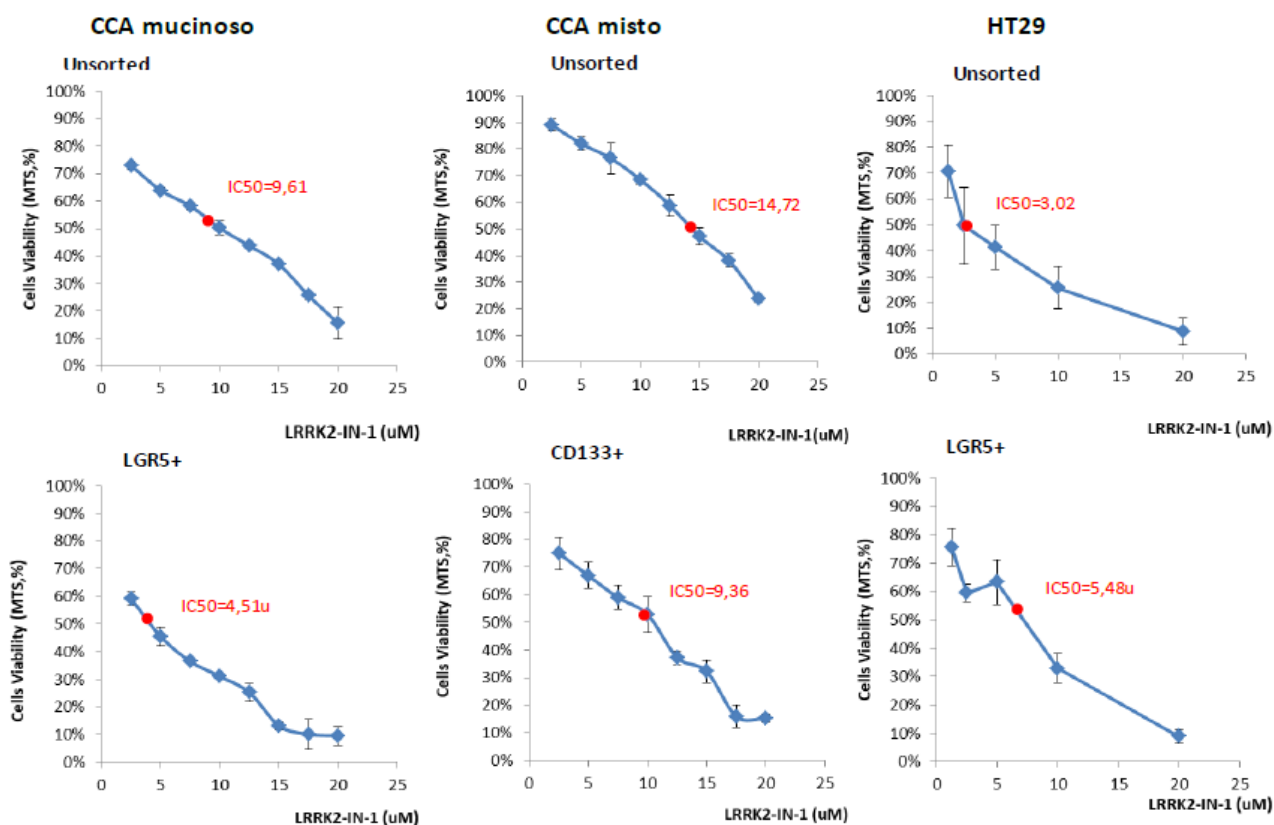


FIGURA 20: Vitalità cellulare considerata al crescere della concentrazione dell'inibizione di DCLK1 tramite la curva dose-risposta

La curva dose-risposta delle cellule di CCA-mucinoso tanto della popolazione Unsorted che LGR5+ mostra come al crescere della concentrazione di inibitore diminuisce la vitalità.

La curva dose-risposta delle cellule di CCA-misto tanto della popolazione Unsorted che CD133+ mostra come al crescere della concentrazione di inibitore diminuisce la vitalità.

La curva dose-risposta delle HT29 tanto della popolazione Unsorted che LGR5+ mostra come al crescere della concentrazione di inibitore diminuisce la vitalità.

Ha mostrato avere maggiore sensibilità all'inibizione di DCLK1 il sottotipo LGR5+ di CCA mucinoso con una $IC_{50}=4,51\mu M$.

12. BIBLIOGRAFIA:

- 1) Gatto M., Alvaro D. *New insights on cholangiocarcinoma*. World J Gastrointest Oncol 2010 March 15; 2(3): 136-145
- 2) Alvaro D, Cardinale V. *Neoplasie delle vie biliari*. In Manuale di Gastroenterologia. Unigastro Ed. 2013-2015: 119-125
- 3) Banales JM, Cardinale V, Carpino G, Marzioni M, Andersen JB, Invernizzi P, Lind GE, Folseraas T, Forbes SJ, Fouassier L, Geier A, Calvisi DF, Mertens JC, Trauner M, Benedetti A, Maroni L, Vaquero J, Macias RI, Raggi C, Perugorria MJ, Gaudio E, Boberg KM, Marin JJ, Alvaro D. *Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA)*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2016 May;13(5):261-80.
- 4) Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, eds. *TNM classification of malignant tumours*. 7th edition. Oxford: Wiley-Blackwell, 2009
- 5) Cardinale V, Torrice A, Alvaro D et al. Intra-hepatic and extra-hepatic cholangiocarcinoma: *New insight into epidemiology and risk factors*. World J Gastrointest Oncol 2010 November 15; 2(11): 407-416
- 6) I numeri del cancro in Italia 2014, a cura di AIRTUM e AIOM (dati riferiti a triennio 2007-'10), e relative Elaborazioni.
- 7) Database ITACAN: Tumori in Italia, a cura di AIRTUM (www.registri-tumori.it)
- 8) Khan SA, Toledano MB, Taylor-Robinson SD: Epidemiology, risk factors, and pathogenesis of cholangiocarcinoma. HPB (Oxford) 10:77–2, 2008
- 9) Komuta M, Govaere O, Vandecaveye V, Akiba J, Van Steenberghe W, Verslype C, Laleman W, Pirenne J, Aerts R, Yano H, Nevens F, Topal B, Roskams T. *Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes*. Hepatology. 2012 Jun;55(6):1876-88
- 10) Rizvi S, Gores G.J *Molecular Pathogenesis of cholangiocarcinoma*. Dig.Dis. 2014; 32(5): 564-9
- 11) Tyson GL, El-Serag HB: Risk factors for cholangiocarcinoma. Hepatology 54:173–84, 2011

- 12) Komuta M, Spee B, Vander Borgh S et al: Clinicopathological study on cholangiolocellular carcinoma suggesting hepatic progenitor cell origin. *Hepatology* 47:1544-56, 2008
- 13) Akiba J, Nakashima O, Hattori S et al: Clinicopathologic analysis of combined hepatocellular- cholangiocarcinoma according to the latest WHO classification. *Am J Surg Pathol* 37:496-05, 2013
- 14) Theise ND, Yao JL, Harada K et al: Hepatic 'stem cell' malignancies in adults: four cases. *Histopathology* 43:263- 71, 2003
- 15) Woo HG, Lee JH, Yoon JH et al: Identification of a cholangiocarcinoma-like gene expression trait in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 70:3034-41, 2010
- 16) Haswell-Elkins MR, Satarug S, Tsuda M et al: Liver fluke infection and cholangiocarcinoma: model of endogenous nitric oxide and extragastric nitrosation in human carcinogenesis. *Mutat Res* 305:241-52, 1994
- 17) Holzinger F, Z'graggen K, Büchler MW et al: Mechanisms of biliary carcinogenesis: a pathogenetic multi-stage cascade towards cholangiocarcinoma. *Ann Oncol* 10 Suppl 4:122-6, 1999
- 18) Komori J, Marusawa H, Machimoto T et al: Activation-induced cytidine deaminase links bile duct inflammation to human cholangiocarcinoma. *Hepatology* 47:888-96, 2008
- 19) Sia D, Hoshida Y, Villanueva A et al: Integrative molecular analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma reveals 2 classes that have different outcomes. *Gastroenterology* 144:829-40, 2013
- 20) Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, et al: Interleukin-6 contributes to Mcl-1 up-regulation and TRAIL resistance via an Akt-signaling pathway in cholangiocarcinoma cells. *Gastroenterology* 128:2054-65, 2005
- 20) Frampton G, Invernizzi P, Bernuzzi F, et al: Interleukin-6-driven progranulin expression increases cholangiocarcinoma growth by an Akt-dependent mechanism. *Gut* 61:268-77, 2012
- 21) Isomoto H1, Mott JL, Kobayashi S, et al: Sustained IL-6/STAT-3 signaling in cholangiocarcinoma cells due to SOCS-3 epigenetic silencing. *Gastroenterology* 132:384-96, 2007

- 22) Braconi C, Huang N, Patel T: MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes. *Hepatology* 51:881-90, 2010
- 23) Tadlock L, Patel T: Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling in transformed growth of a cholangiocarcinoma cell line. *Hepatology* 33:43-1, 2001
- 24) Wong N, Li L, Tsang K, et al: Frequent loss of chromosome 3p and hypermethylation of RASSF1A in cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 37:633-39, 2002
- 25) Zabron A, Edwards RJ, Khan SA: The challenge of cholangiocarcinoma: dissecting the molecular mechanisms of an insidious cancer. *Dis Model Mech* 6: 281-92, 2013
- 26) Yoon JH, Canbay AE, Werneburg NW, et al: Oxysterols induce cyclooxygenase-2 expression in cholangiocytes: implications for biliary tract carcinogenesis. *Hepatology* 39:732-38, 2004
- 27) Zhang Z, Lai GH, Sirica AE: Celecoxib-induced apoptosis in rat cholangiocarcinoma cells mediated by Akt inactivation and Bax translocation. *Hepatology* 39:1028-37, 2006
- 28) Grossman EM, Longo WE, Panesar N, et al: The role of cyclooxygenase enzymes in the growth of human gall bladder cancer cells. *Carcinogenesis* 21: 1403-09, 2000
- 29) Han C, Wu T: Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 promotes human cholangiocarcinoma cell growth and invasion through EP1 receptor-mediated activation of the epidermal growth factor receptor and Akt. *J Biol Chem* 280:24053-63, 2005
- 30) Marino D, Leone F, Cavalloni G, et al: Biliary tract carcinomas: from chemotherapy to targeted therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 85:136-48, 2013
- 31) Leone F, Cavalloni G, Pignochino Y, et al: Somatic mutations of epidermal growth factor receptor in bile duct and gallbladder carcinoma. *Clin Cancer Res* 12:1680-85, 2006
- 32) Harder J, Waiz O, Otto F, et al: EGFR and HER2 expression in advanced biliary tract cancer. *World J Gastroenterol* 15:4511-17, 2009
- 33) Pignochino Y, Sarotto I, Peraldo-Neia C, et al: Targeting EGFR/HER2 pathways enhances the antiproliferative effect of gemcitabine in biliary tract and gallbladder carcinomas. *BMC Cancer* 10:631, 2010
- 34) Toledo C, Matus CE, Barraza X, et al: Expression of HER2 and bradykinin B₂ receptors in precursor lesions of gallbladder carcinoma. *World J Gastroenterol* 18:1208-15, 2012

- 35) Chaube A, Tewari M, Garbyal RS, et al: Preliminary study of p53 and c-erbB-2 expression in gallbladder cancer in Indian patients. *BMC Cancer* 6:126, 2006
- 36) Malka D, Cervera P, Foulon S , et al: Gemcitabine and oxaliplatin with or without cetuximab in advanced biliary- tract cancer (BINGO): a randomised, open-label, non-comparative phase 2 trial. *Lancet Oncol* 15:819- 28, 2014
- 37) Tannapfel A, Sommerer F, Benicke M, et al: Mutations of the BRAF gene in cholangiocarcinoma but not in hepatocellular carcinoma. *Gut* 52:706-12, 2003
- 38) Riener MO, Bawohl M, Clavien PA, et al: Rare PIK3CA hotspot mutations in carcinomas of the biliary tract. *Genes Chromosomes Cancer* 47:363-67, 2008
- 39) Endo K, Yoon BI, Pairojkul C, et al: ERBB-2 overexpression and cyclooxygenase-2 up-regulation in human cholangiocarcinoma and risk conditions. *Hepatology* 439–50, 2002
- 40) Zhang L, Jiang L, Sun Q, et al: Prostaglandin E2 enhances mitogen-activated protein kinase/Erk pathway in human cholangiocarcinoma cells: involvement of EP1 receptor, calcium and EGF receptors signaling. *Mol Cell Biochem* 305:19-6, 2007
- 41) Kiguchi K, Ruffino L, Kawamoto T, et al: Therapeutic effect of CS-706, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, on gallbladder carcinoma in BK5.ErbB-2 mice. *Mol Cancer Ther* 6:1709-17, 2007
- 42) Kiguchi K, Carbajal S, Chan K, et al: Constitutive expression of ErbB-2 in gallbladder epithelium results in development of adenocarcinoma. *Cancer Res* 61:6971-76, 2001
- 43) Miyamoto M, Ojima H, Iwasaki M, et al: Prognostic significance of overexpression of c-Met oncoprotein in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 105:131-38, 2011
- 44) Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, et al: Vascular Endothelial Growth Factor stimulates rat cholangiocyte proliferation via an autocrine mechanism. *Gastroenterology* 130:1270-82, 2006
- 45) Ogasawara S, Yano H, Higaki K, et al: Expression of angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in human biliary tract carcinoma cell lines. *Hepatol Res* 20:97-113, 2001
- 46) Tang D, Nagano H, Yamamoto H, et al: Angiogenesis in cholangiocellular carcinoma: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietin-1/2, thrombospondin-1 and clinicopathological significance. *Oncol Rep* 15:525-32, 2006

- 46) Kim SY, Oh YL, Kim KM, et al: Decreased expression of Bax-interacting factor-1 (Bif-1) in invasive urinary bladder and gallbladder cancers. *Pathology* 40:553-57, 2008
- 47) Yoshida T, Sugai T, Habano W, et al: Microsatellite instability in gallbladder carcinoma: two independent genetic pathways of gallbladder carcinogenesis. *J Gastroenterol* 35:768-74, 2000
- 48) Xiaofang L, Kun T, Shaoping Y, et al: Correlation between promoter methylation of p14(ARF), TMS1/ASC, and DAPK, and p53 mutation with prognosis in cholangiocarcinoma. *World J Surg Oncol* 10:5, 2012
- 49) Moreno M, Pimentel F, Gazdar AF, et al: TP53 abnormalities are frequent and early events in the sequential pathogenesis of gallbladder carcinoma. *Ann Hepatol* 4:192-99, 2005
- 50) Tannapfel A, Sommerer F, Benicke M, et al: Genetic and epigenetic alterations of the INK4a-ARF pathway in cholangiocarcinoma. *J Pathol* 197:624-31, 2002
- 51) Borger DR, Tanabe KK, Fan KC, et al: Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping. *Oncologist* 17:72-9, 2012
- 52) Kipp BR, Voss JS, Kerr SE, et al: Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cholangiocarcinoma. *Hum Pathol* 43:1552-58, 2012
- 53) Cairns RA, Mak TW: Oncogenic isocitrate dehydrogenase mutations: mechanisms, models, and clinical opportunities. *Cancer Discov* 3:730-41, 2013
- 54) Ong CK, Subimerb C, Pairojkul C, et al: Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Nat Genet* 44:690-93, 2012
- 55) Jiao Y, Pawlik TM, Anders RA, et al: Exome sequencing identifies frequent inactivating mutations in BAP1, ARID1A and PBRM1 in intrahepatic cholangiocarcinomas. *Nat Genet* 45:1470-73, 2013
- 56) Francis H, Alpini G, DeMorrow S: Recent advances in the regulation of cholangiocarcinoma growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299: G1-9, 2010
- 57) Yang B, House MG, Guo M, et al: Promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma. *Mod Pathol* 18:412-20, 2005

- 58) Homayounfar K1, Gunawan B, Cameron S, et al: Pattern of chromosomal aberrations in primary liver cancers identified by comparative genomic hybridization. *Hum Pathol* 40:834-42, 2009
- 59) Li B, Han Q, Zhu Y, et al: Down-regulation of miR-214 contributes to intrahepatic cholangiocarcinoma metastasis by targeting Twist. *FEBS J* 279:2393-98, 2012
- 60) Araki K, Shimura T, Suzuki H, et al: E/N-cadherin switch mediates cancer progression via TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition in extrahepatic cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 105:1885-93, 2011
- 61) Seol MA, Chu IS, Lee MJ, et al: Genome-wide expression patterns associated with oncogenesis and sarcomatous transdifferentiation of cholangiocarcinoma. *BMC Cancer* 11:78, 2011
- 62) Yao X, Wang X, Wang Z, et al: Clinicopathological and prognostic significance of epithelial mesenchymal transition-related protein expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Onco Targets Ther* 5:255-61, 2012
- 63) Sato Y, Harada K, Itatsu K, et al: Epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor- β 1/Snail activation aggravates invasive growth of cholangiocarcinoma. *Am J Pathol* 177:141-52, 2010
- 64) Itatsu K, Zen Y, Yamaguchi J, et al: Expression of matrix metalloproteinase 7 is an unfavorable postoperative prognostic factor in cholangiocarcinoma of the perihilar, hilar, and extrahepatic bile ducts. *Hum Pathol* 39:710- 19, 2008
- 65) Itatsu K, Sasaki M, Yamaguchi J, et al: Cyclooxygenase-2 is involved in the up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in cholangiocarcinoma induced by tumor necrosis factor- α . *Am J Pathol* 174:829-41, 2009
- 66) Zabron A, Horneffer-van der Sluis VM, Wadsworth CA, et al: Elevated levels of neutrophil gelatinase- associated lipocalin in bile from patients with malignant pancreatobiliary disease. *Am J Gastroenterol* 106:1711- 17, 2011
- 67) Chuaysri C, Thuwajit P, Paupairoj A, et al: Alpha-smooth muscle actin-positive fibroblasts promote biliary cell proliferation and correlate with poor survival in cholangiocarcinoma. *Oncol Rep* 21:957-69, 2009

- 68) Okabe H, Beppu T, Hayashi H, et al: Hepatic stellate cells may relate to progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 16:2555-64, 2009
- 69) Quante M, Tu SP, Tomita H, et al: Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell* 19:257-72, 2011
- 70) Aishima S, Taguchi K, Sugimachi K, et al: The role of thymidine phosphorylase and thrombospondin-1 in angiogenesis and progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Int J Surg Pathol* 10:47-6, 2002
- 71) Aishima S, Taguchi K, Terashi T, et al: Tenascin expression at the invasive front is associated with poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Mod Pathol* 16:1019-27, 2003
- 72) Leelawat K, Leelawat S, Narong S, et al: Roles of the MEK1/2 and AKT pathways in CXCL12/CXCR4 induced cholangiocarcinoma cell invasion. *World J Gastroenterol*. 13:1561-68, 2007
- 73) Mertens JC, Fingas CD, Christensen JD, et al: Therapeutic effects of deleting cancer-associated fibroblasts in cholangiocarcinoma. *Cancer Res* 73:897-07, 2013
- 74) Shimonishi T, Miyazaki K, Kono N, et al: Expression of endogenous galectin-1 and galectin-3 in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum Pathol* 32:302-10, 2001
- 75) Utispan K, Sonongbua J, Thuwajit P, et al: Periostin activates integrin $\alpha 5\beta 1$ through a PI3K/AKT- dependent pathway in invasion of cholangiocarcinoma. *Int J Oncol* 41:1110-18, 2012
- 76) Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, et al. WHO classification of tumours of the digestive system. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2010
- 77) Edge SB. American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York: Springer; 2009
- 78) Klatskin G. Adenocarcinoma of the hepatic duct at its bifurcation within the porta hepatis. An unusual tumor with distinctive clinical and pathological features. *Am J Med* 38: 241-56, 1965
- 79) Khan SA, Miras A, Pelling M, et al. : Cholangiocarcinoma and its management. *Gut*, 2007; 56: 1755–56

- 80) Nakanuma Y, Minato H, Kida T, et al. : Pathology of cholangiocellular carcinoma. In: Tobe T, Kameda H, Okudaira M, et al. Primary liver cancer in Japan. Tokyo, Japan: Springer-Verlag; 39-50, 1994
- 81) Nakanuma Y, Leong AS, Sripa B, et al.: Intrahepatic cholangiocarcinoma. In: Hamilton SR, Aaltonen LA. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Lyon: IARC Press; 158-183, 2000
- 82) Welzel TM, McGlynn KA, Hsing AW, et al.: Impact of classification of hilar cholangiocarcinomas (Klatskin tumors) on the incidence of intra- and extrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. J Natl Cancer Inst 98: 873-5, 2006
- 83) Razumilava N, Gores GJ.: Cholangiocarcinoma. Lancet 383: 2168–79, 2014
- 84) DeOliveira ML, Cunningham SC, Cameron JL et al.: Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. Ann Surg 245:755–762, 2007
- 85) Deoliveira ML, Schulick RD, Nimura Y et al.: New staging system and a registry for perihilar cholangiocarcinoma. Hepatology 53: 1363–71, 2011
- 86) Blechacz B, Komuta M, Roskams T, et al.: Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 8: 512–522, 2011
- 87) Bridgewater J, Galle PR, Khan SA, et al.: Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. J Hepatol. 60(6):1268-89, 2014 J
- 88) Yeh MM.: Pathology of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma. J Gastroenterol Hepatol 25: 1485–1492, 2010
- 89) Joo I, Lee JM.: Imaging bile duct tumors: pathologic concepts, classification, and early tumor detection. Abdom Imaging 38: 1334–1350, 2013
- 90) Nakanuma Y, Sato Y, Harada K, et al.: Pathological classification of Intrahepatic cholangiocarcinoma based on a new concept. World J Hepatol 2: 419–427, 2010
- 91) Shetty AS, Fowler KJ, Brunt EM, et al.: Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma: what the radiologist needs to know about biphenotypic liver carcinoma. Abdom Imaging 39(2): 310–322, 2014
- 92) Oliveira IS, Kilcoyne A, Everett JM4, Mino-Kenudson M, Harisinghani MG, Ganesan K. *Cholangiocarcinoma: classification, diagnosis, staging, imaging features, and management*. Abdom Radiol (NY). 2017 Mar 7.

- 93) Associazione Italiana per lo Studio del Fegato. Commissione Colangiocarcinoma, ed. *Il colangiocarcinoma*. Roma: Associazione Italiana per lo Studio del Fegato, AISF, 2009
- 94) Sainani NI, Catalano OA, Holalkere NS, et al.: Cholangiocarcinoma: current and novel imaging techniques. *Radiographics* 28: 1263–1287, 2008
- 95) Bruix J, Sherman M.: American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 53(3):1020-1022, 2011
- 96) Vilgrain V.: Staging cholangiocarcinoma by imaging studies. *HPB (Oxford)* 10: 106–109, 2008
- 97) Corvera CU, Blumgart LH, Akhurst T, et al.: 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography influences management decisions in patients with biliary cancer. *J Am Coll Surg* 206:57–65, 2008
- 98) Kim JY, Kim MH, Lee TY, et al.: Clinical role of 18F-FDG PET-CT in suspected and potentially operable cholangiocarcinoma: a prospective study compared with conventional imaging. *Am J Gastroenterol* 103:1145– 1151, 2008
- 99) Petrowsky H, Wildbrett P, Husarik DB, et al.: Impact of integrated positron emission tomography and computed tomography on staging and management of gallbladder cancer and cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 45:43–50, 2006
- 100) Seo S, Hatano E, Higashi T, et al.: Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts lymph node metastasis, P-glycoprotein expression, and recurrence after resection in mass- forming intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surgery* 143:769– 777, 2008
- 101) Anderson CD, Rice MH, Pinson CW, et al.: Fluorodeoxyglucose PET imaging in the evaluation of gallbladder carcinoma and cholangiocarcinoma. *J Gastrointest Surg* 8:90–97, 2004
- 102) Kim YJ, Yun M, Lee WJ, et al.: Usefulness of 18F-FDG PET in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30: 1467–1472, 2003
- 103) Edge SB. American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York: Springer; 2009

- 104) Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C.: TNM Classification of Malignant Tumours (UICC International Union Against Cancer). 7th edn. Wiley-Blackwell, 2009
- 105) Yamasaki S.: Intrahepatic cholangiocarcinoma: macroscopic type and stage classification. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 10: 288–291, 2003
- 106) Nathan H, Aloia TA, Vauthey JN et al.: A proposed staging system for intrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 16: 14–22, 2009
- 107) Okabayashi T, Yamamoto J, Kosuge T, et al.: A new staging system for mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma: analysis of preoperative and postoperative variables. *Cancer* 92: 2374–2383, 2001
- 108) Farges O, Fuks D, Le Treut YP, et al.: AJCC 7th edition of TNM staging accurately discriminates outcomes of patients with resectable intrahepatic cholangiocarcinoma: by the AFC-IHCC-2009 study group. *Cancer* 117: 2170–2177, 2011
- 109) Blehacz B, Komuta M, Roskams T, et al.: Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8: 512–522, 2011
- 110) Blehacz B, Gores GJ.: Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Hepatology* 48: 308–321, 2008
- 111) Edge SB, Compton CC.: The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* 17:1471–1474, 2010
- 112) Paul A, Kaiser GM, Molmenti EP, et al.: Klatskin tumors and the accuracy of the Bismuth-Corlette classification. *Am Surg* 77: 1695–1699, 2011
- 113) Park J, Kim MH, Kim KP, et al.: Natural history and prognostic factors of advanced cholangiocarcinoma without surgery, chemotherapy, or radiotherapy: a large-scale observational study. *Gut Liver* 3: 298–305, 2009
- 114) Zervos EE, Osborne D, Goldin SB, et al.: Stage does not predict survival after resection of hilar cholangiocarcinomas promoting an aggressive operative approach. *Am J Surg* 190: 810–815, 2005
- 115) Chung YE, Kim MJ, Park YN, et al.: Varying appearances of

- cholangiocarcinoma: radiologic–pathologic correlation. *Radiographics* 29: 683–700, 2009
- 116) Jarnagin W, Winston C.: Hilar cholangiocarcinoma: diagnosis and staging. *HPB (Oxford)* 7(4): 244-251, 2005
- 117) Jarnagin WR, Fong Y, De Matteo RP, et al.: Staging, resectability, and outcome in 225 patients with hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 234: 507–517, 2001
- 118) Soares KC, Kamel I, Cosgrove DP et al.: Hilar cholangiocarcinoma: diagnosis, treatment options, and management. *Hepatobiliary Surg Nutr* 3(1): 18-34, 2014
- 119) DeOliveira ML, Cunningham SC, Cameron JL et al.: Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Ann Surg* 245:755–762, 2007
- 120) Shimada K, Sano T, Sakamoto Y et al.: Surgical outcomes of the mass-forming plus periductal infiltrating types of intrahepatic cholangiocarcinoma: a comparative study with the typical mass-forming type of intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Surg* 31: 2016–2022, 2007
- 121) Bridgewater J, Galle PR, Khan SA, et al.: Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol.* 60(6):1268-89, 2014
- 122) Lee HY, Kim SH, Lee JM, et al.: Preoperative assessment of resectability of hepatic hilar cholangiocarcinoma: combined CT and cholangiography with revised criteria. *Radiology* 239: 113–121, 2006
- 123) Ruys AT, van Beem BE, Engelbrecht MR, et al.: Radiological staging in patients with hilar cholangiocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Br J Radiol* 85: 1255–62, 2012
- 124) Pasanen PA, Partanen KP, Pikkarainen PH et al.: A comparison of ultrasound, computed tomography and endoscopic retrograde in the differential diagnosis of benign and malignant jaundice and cholestasis. *Eur. J. Surg.* 159: 23–9, 1993
- 125) Bloom CM, Langer B, Wilson SR.: Role of US in the detection,

characterization, and staging of cholangiocarcinoma. *Radiographics* 19: 1199–218, 1999

126) Choi JY, Kim MJ, Lee JM, et al.: Hilar cholangiocarcinoma: role of preoperative imaging with sonography, MDCT, MRI, and direct cholangiography. *AJR Am J Roentgenol.* 2008;191(5):1448-1457,

127) Lalani T, Couto CA, Rosen MP, et al.: ACR Appropriateness Criteria - Jaundice. *J Am Coll Radiol* 10:402-409, 2013

128) Khan SA, Davidson BR, Goldin R, et al.: Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: consensus document. *Gut* 51:1–9, 2002

129) Chen HW, Pan AZ, Zhen ZJ, et al.: Preoperative evaluation of resectability of Klatskin tumor with 16-MDCT angiography and cholangiography. *AJR Am J Roentgenol* 186:1580–6, 2006

130) Charatcharoenwittaya P, Enders FB, Halling KC, et al.: Utility of serum tumor markers, imaging, and biliary cytology for detecting cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 48:1106e17, 2008

131) Jung AY, Lee JM, Choi SH, et al.: CT features of an intraductal polypoid mass: differentiation between hepatocellular carcinoma with bile duct tumor invasion and intraductal papillary cholangiocarcinoma. *J Comput Assist Tomogr* 30: 173–181, 2006

132) Lacomis JM, Baron RL, Oliver JH 3rd, et al.: Cholangiocarcinoma: delayed CT contrast enhancement patterns. *Radiology* 203: 98–104, 1997

133) Tongdee T, Amornvittayachan O, Tongdee R.: Accuracy of multidetector computed tomography cholangiography in evaluation of cause of biliary tract obstruction. *J Med Assoc Thai.* 93(5):566-573, 2010

134) Bang BW, Jeong S, Lee DH, et al.: Curved planar reformatted images of MDCT for differentiation of biliary stent occlusion in patients with malignant biliary obstruction. *AJR Am J Roentgenol.* 194(6):1509-1514, 2010

135) Zandrino F, Benzi L, Ferretti ML, et al.: Multislice CT cholangiography without biliary contrast agent: technique and initial clinical results in the assessment of patients with biliary obstruction. *Eur Radiol* 12: 1155–1161, 2002

- 136) Ahmetoglu A, Kosucu P, Kul S, et al.: MDCT cholangiography with volume rendering for the assessment of patients with biliary obstruction. *AJR Am J Roentgenol* 183: 1327–1332, 2004
- 137) Ryoo I, Lee JM, Chung YE et al.: Gadobutrol-enhanced, three-dimensional, dynamic MR imaging with MR cholangiography for the preoperative evaluation of bile duct cancer. *Invest Radiol* 45: 217–224, 2010
- 138) Zech CJ, Schoenberg SO, Reiser M, et al.: Cross-sectional imaging of biliary tumors: current clinical status and future developments. *Eur Radiol* 14:1174–1187, 2004
- 139) Otto G, Romaneehsen B, Hoppe-Lotichius M, et al.: Hilar cholangiocarcinoma: resectability and radicality after routine diagnostic imaging. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 11: 310–318, 2004
- 140) Aloia TA, Charnsangavej C, Faria S et al.: High-resolution computed tomography accurately predicts resectability in hilar cholangiocarcinoma. *Am J Surg* 193: 702–706, 2007
- 141) Park MS, Lee DK, Kim MJ, et al.: Preoperative staging accuracy of multidetector row computed tomography for extrahepatic bile duct carcinoma. *J Comput Assist Tomogr* 30: 362–367, 2006
- 142) Unno M, Okumoto T, Katayose Y, et al.: Preoperative assessment of hilar cholangiocarcinoma by multidetector row computed tomography. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 14: 434–440, 2007
- 143) Watadani T, Akahane M, Yoshikawa T, et al.: Preoperative assessment of hilar cholangiocarcinoma using multidetector-row CT: correlation with histopathological findings. *Radiat Med* 26: 402–407, 2008
- 144) Choi JY, Lee JM, Lee JY, et al.: Assessment of hilar and extrahepatic bile duct cancer using multidetector CT: value of adding multiplanar reformations to standard axial images. *Eur Radiol* 17: 3130–3138, 2007
- 145) Kim HJ, Lee DH, Lim JW, et al.: Multidetector Computed Tomography in the Preoperative Workup of Hilar Cholangiocarcinoma. *Acta Radiol* 50: 845-853, 2009
- 146) E, Nimura Y, Hayakawa N, et al.: The pattern of infiltration at the proximal

border of hilar bile duct carcinoma: a histologic analysis of 62 resected cases. *Ann Surg* 227: 405–411, 1998

147) Akamatsu N, Sugawara Y, Hashimoto D, et al.: Surgical strategy for bile duct cancer: advances and current limitations. *World J Clin Oncol* 2: 94–107, 2011

148) Masselli G, Manfredi R, Vecchioli A, et al.: MR imaging and MR cholangiopancreatography in the preoperative evaluation of hilar cholangiocarcinoma: correlation with surgical and pathologic findings. *Eur Radiol* 18: 2213– 2221, 2008

149) Zhang Y, Uchida M, Abe T et al: Intrahepatic peripheral cholangiocarcinoma: comparison of dynamic CT and dynamic MRI. *J Comput Assist Tomogr*, 23: 670–77, 1999

150) Yeh TS, Jan YY, Tseng JH et al: Malignant perihilar biliary obstruction; magnetic resonance cholangiopancreatographic findings. *Am J Gastroenterol*, 95: 432–40, 2000

151) Park HS, Lee JM, Choi JY, et al.: Preoperative evaluation of bile duct cancer: MRI combined with MR cholangiopancreatography versus MDCT with direct cholangiography. *AJR Am J Roentgenol*. 190(2):396-405, 2008

152) Vogl TJ, Schwarz WO, Heller M, et al.: Staging of Klatskin tumours (hilar cholangiocarcinomas): comparison of MR cholangiography, MR imaging, and endoscopic retrograde cholangiography. *Eur Radiol* 16: 2317–2325, 2006

153) Cha JH, Han JK, Kim TK et al.: Preoperative evaluation of Klatskin tumor: accuracy of spiral CT in determining vascular invasion as a sign of unresectability. *Abdom Imaging* 25: 500 – 507, 2000

154) Ashok KS.: Role of MRCP versus ERCP in bile duct cholangiocarcinoma and benign stricture. *Biomed Imaging Interv J* 3:e12e545, 2007

155) Romagnuolo J, Bardou M, Rahme E, et al.: Magnetic resonance cholangiopancreatography: a meta-analysis of test performance in suspected biliary disease. *Ann Intern Med* 139:547–57, 2003

156) Barish MA, Yocel EK, Ferrucci JT.: Magnetic resonance cholangiopancreatography. *New Engl J Med* 341:258– 64, 1999

- 157) Van Beers BE.: Diagnosis of cholangiocarcinoma. *HPB (Oxford)* 10: 87-93, 2008
- 158) Lopera JE, Soto JA, Munera F.: Malignant hilar and perihilar biliary obstruction: use of MR cholangiography to define the extent of biliary ductal involvement and plan percutaneous interventions. *Radiology* 220:90–6, 2001
- 159) Manfredi R, Barbaro B, Masselli G, et al.: Magnetic resonance imaging of cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis* 24: 155–164, 2004
- 160) Muggli D, Müller MA, Karlo C et al.: A simple method to approximate liver size on cross-sectional images using living liver models. *Clin Radiol* 64: 682 – 689, 2009
- 161) Masselli G, Gualdi G. Hilar CCA: MRI/MRCP in staging and treatment planning. *Abdom Imaging* 33:444-451, 2008
- 162) Chryssou E, Guthrie JA, Ward J, et al.: Hilar cholangiocarcinoma: MR correlation with surgical and histological findings. *Clin Radiol* 65: 781-788, 2010
- 163) Hänninen EL, Pech M, Jonas S, et al.: Magnetic resonance imaging including magnetic resonance cholangiopancreatography for tumor localization and therapy planning in malignant hilar obstructions. *Acta Radiol* 2005; 46: 462-470,
- 164) Seo S, Hatano E, Higashi T, et al.: Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts lymph node metastasis, P-glycoprotein expression, and recurrence after resection in mass- forming intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surgery* 143:769– 777, 2008
- 165) Masselli G, Manfredi R, Vecchioli A, et al.: MR imaging and MR cholangiopancreatography in the preoperative evaluation of hilar cholangiocarcinoma: correlation with surgical and pathologic findings. *Eur Radiol* 18: 2213– 2221, 2008
- 166) Sakamoto E, Nimura Y, Hayakawa N, et al.: The pattern of infiltration at the proximal border of hilar bile duct carcinoma: a histologic analysis of 62 resected cases. *Ann Surg* 227: 405–411, 1998
- 167) Zandrino F, Benzi L, Ferretti ML, et al.: Multislice CT cholangiography without biliary contrast agent: technique and initial clinical results in the

- assessment of patients with biliary obstruction. *Eur Radiol* 12: 1155–1161, 2002
- 168) Chung YE, Kim MJ, Park YN, et al.: Staging of extrahepatic cholangiocarcinoma. *Eur Radiol* 18: 2182–2195, 2008
- 169) Weber A, Schmid RM, Prinz C.: Diagnostic approaches for cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 14: 4131– 4136, 2008
- 170) Slattery JM, Sahani DV.: What is the current state-of-the-art imaging for detection and staging of cholangiocarcinoma? *Oncologist* 11: 913–922, 2006
- 171) Costamagna G, Familiari P, Marchese M, et al.: Endoscopic biliopancreatic investigations and therapy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 22(5):865-881, 2008
- 172) Aronson N, Flamm CR, Mark D, et al.: Endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Evid Rep Technol Assess (Summ)*. (50):1-8, 2002
- 173) Hekimoglu K, Ustundag Y, Dusak A, et al.: MRCP vs. ERCP in the evaluation of biliary pathologies: review of current literature. *J Dig Dis*. 9(3):162-169, 2008
- 174) Saad WEA, Wallace MJ, Wojak JC, et al.: Quality Improvement Guidelines for Percutaneous Transhepatic Cholangiography, Biliary Drainage, and Percutaneous Cholecystostomy. *J Vasc Interv Radiol* 21:789–795, 2010
- 175) Khan SA, Davidson BR, Goldin R, et al.: Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: consensus document. *Gut* 51:1–9, 2002
- 176) Weber SM, Jarnagin WR, Klimstra D, et al.: Intrahepatic cholangiocarcinoma: resectability, recurrence pattern, and outcomes. *J Am Coll Surg* 193:384–391, 2001
- 177) Zhimin G, Noor H, Jian-Bo Z, et al.: Advances in diagnosis and treatment of hilar CCA --a review. *Med Sci Monit* 19:648-656, 2013
- 178) Bilbao MK, Dotter CT, Lee TG, et al.: Complications of endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP): a study of 10.000 cases. *Gastroenterology* 70:314–320, 1976
- 179) Krishna NB, Mehra M, Reddy AV, et al.: EUS/EUS-FNA for suspected pancreatic cancer: influence of chronic pancreatitis and clinical presentation with or without obstructive jaundice on performance characteristics. *Gastrointest Endosc*. 70(1):70-79, 2009

- 180) Maranki J, Hernandez AJ, Arslan B, et al.: Interventional endoscopic ultrasound-guided cholangiography: long- term experience of an emerging alternative to percutaneous transhepatic cholangiography. *Endoscopy*. 41(6):532- 538, 2009
- 181) Chen WX, Xie QG, Zhang WF, et al.: Multiple imaging techniques in the diagnosis of ampullary carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 7(6):649-653, 2008
- 182) Petrowsky H, Wildbrett P, Husarik DB, et al.: Impact of integrated positron emission tomography and computed tomography on staging and management of gallbladder cancer and cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 45:43–50, 2006
- 183) Kluge R, Schmidt F, Caca K et al.: Positron emission tomography with [(18) F] fluoro-2-deoxy-D-glucose for diagnosis and staging of bile duct cancer. *Hepatology* 33: 1029–35, 2001
- 184) Martin RC 2nd, Fong Y, DeMatteo RP et al.: Peritoneal washings are not predictive of occult peritoneal disease in patients with hilar cholangiocarcinoma. *J. Am. Coll. Surg*. 193: 620–5, 2001
- 185) Weber SM, DeMatteo RP, Fong Y et al.: Staging laparoscopy in patients with extrahepatic biliary carcinoma. Analysis of 100 patients. *Ann. Surg*. 235: 392–9, 2002
- 186) Tilleman EH, de Castro SM, Busch OR et al.: Diagnostic laparoscopy and laparoscopic ultrasound for staging of patients with malignant proximal bile duct obstruction. *J. Gastrointest. Surg*. 6: 426–30; discussion 430–1, 2002
- 187) Connor S, Barron E, Wigmore SJ et al.: The utility of laparoscopic assessment in the preoperative staging of suspected hilar cholangiocarcinoma. *J. Gastrointest. Surg*. 9: 476–80, 2005
- 188) Goere D, Wagholikar GD, Pessaux P et al.: Utility of staging laparoscopy in subsets of biliary cancers : laparoscopy is a powerful diagnostic tool in patients with intrahepatic and gallbladder carcinoma. *Surg. Endosc*. 20: 721–5, 2006
- 189) Ruys AT, Busch OR, Gouma DJ, et al.: Staging laparoscopy for hilar cholangiocarcinoma: is it still worthwhile? *Ann Surg Oncol* 18: 2647-2653, 2011
- 190) Sakamoto Y, Kosuge T, Shimada K, et al.: Prognostic factors of surgical resection in middle and distal bile duct cancer: an analysis of 55 patients concerning the significance of ductal and radial margins. *Surgery* 137:396– 402, 2005

- 191) Hong SM, Pawlik TM, Cho H, et al.: Depth of tumor invasion better predicts prognosis than the current American Joint Committee on Cancer T classification for distal bile duct carcinoma. *Surgery* 146: 250–257, 2009
- 192) Murakami Y, Uemura K, Hayashidani Y, et al.: Prognostic significance of lymph node metastasis and surgical margin status for distal cholangiocarcinoma. *J Surg Oncol* 95: 207–212, 2007
- 193) Yoshida T, Matsumoto T, Sasaki A et al.: Lymphatic spread differs according to tumor location in extrahepatic bile duct cancer. *Hepatogastroenterology* 50: 17–20, 2003
- 194) Slattery JM, Sahani DV.: What is the current state-of-the-art imaging for detection and staging of cholangiocarcinoma? *Oncologist* 11: 913–922, 2006
- 195) Razumilava N, Gores GJ.: Classification, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 11:13-21, 2013
- 196) Xingming Jiang, Ning Ma, Dayong Wang, Fuyuan Li, Rongzhang He, Dongliang Li, Ruiqi Zhao, Qingxin Zhou, Yimin Wang, Fumin Zhang, Ming Wan, Pengcheng Kang, Xu Gao, and Yunfu Cui *Metformin inhibits tumor growth by regulating multiple miRNAs in human cholangiocarcinoma* *Oncotarget*. 2015 Feb; 6(5): 3178–3194
- 197) Fraveto A, Cardinale V, Bragazzi MC, Giuliani F, De Rose AM, Grazi GL, Napoletano C, Semeraro R, Lustri AM, Costantini D, Nevi L, Di Matteo S, Renzi A, Carpino G, Gaudio E, Alvaro D. *Sensitivity of Human Intrahepatic Cholangiocarcinoma Subtypes to Chemotherapeutics and Molecular Targeted Agents: A Study on Primary Cell Cultures*. *PLoS One*. 2015 Nov 16;10(11): e0142124.
- 198) Cardinale V, Bragazzi MC, Alvaro D et al. *Cholangiocarcinoma: increasing burden of classifications*. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2013;2(5):272-280
- 199) Fabris L, Cadamuro M, Moserle L, Dziura J, Cong X, Sambado L, et al. Nuclear expression of S100A4 calcium-binding protein increases cholangiocarcinoma invasiveness and metastasization. *HEPATOLOGY* 2011;54:890-899.
- 200) Chapman MH, Sandanayake NS, Andreola F, Dhar DK, Webster GJ, Dooley JS, et al. Circulating CYFRA 21-1 is a specific diagnostic and prognostic biomarker in biliary tract cancer. *J Clin Exp Hepatol* 2011; 1:6-12.

- 201) Farges O, Fuks D: Clinical presentation and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Gastroenterol Clin Biol.* 34:191-199, 2010
- 202) Ribero D, Pinna AD, Guglielmi A, et al.: Surgical Approach for Long-term Survival of Patients With Intrahepatic Cholangiocarcinoma: A Multi-institutional Analysis of 434 Patients. *Arch Surg.* 147:1107-13, 2012
- 203) Poultides GA, Zhu AX, Choti MA, et al.: Intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surg Clin North Am.* 90:817-37, 2010
- 204) Benson AB 3rd, D'Angelica MI, Abrams TA, et al.: Hepatobiliary cancers, version 2.2014. *J Natl Compr Canc Netw.* 12:1152-82, 2014
- 205) Joseph S, Connor S, Garden OJ. Staging laparoscopy for cholangiocarcinoma. *HPB (Oxford).* 2008;10(2):116-9
- 206) Paik KY, Jung JC, Heo JS, et al.: What prognostic factors are important for resected intrahepatic cholangiocarcinoma? *J Gastroenterol Hepatol.* 23(5):766-70, 2008
- 207) Lang H, Sotiropoulos GC, Sgourakis G, et al.: Operations for intrahepatic cholangiocarcinoma: single-institution experience of 158 patients. *J Am Coll Surg.* 208:218-28, 2009
- 208) Ali SM, Clark CJ, Mounajjed T, et al.: Model to predict survival after surgical resection of intrahepatic cholangiocarcinoma: the Mayo Clinic experience. *HPB (Oxford).* 17:244-50, 2015
- 209) Spolverato G, Yakoob MY, Kim Y, et al.: The Impact of Surgical Margin Status on Long-Term Outcome After Resection for Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol*, 2015 [Epub ahead of print]
- 2010) Tamandl D, Herberger B, Gruenberger B, et al.: Influence of hepatic resection margin on recurrence and survival in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol.* 15:2787-94, 2008
- 211) Farges O, Fuks D, Boleslawski E, et al.: Influence of surgical margins on outcome in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma: a multicenter study by the AFC-IHCC-2009 study group. *Ann Surg.* 254:824-29; discussion 830, 2011
- 212) Nakagawa T, Kamiyama T, Kurauchi N, et al.: Number of lymph node metastases is a significant prognostic factor in intrahepatic cholangiocarcinoma.

World J Surg 29:728–733, 2005

- 213) de Jong MC, Nathan H, Sotiropoulos GC, et al.: Intrahepatic cholangiocarcinoma: an international multi- institutional analysis of prognostic factors and lymph node assessment. J Clin Oncol. 29:3140-5, 2011
- 214) Kim HM, Park JY, Kim KS, et al.: Intraductal ultrasonography combined with percutaneous transhepaticcholangioscopy for the preoperative evaluation of longitudinal tumor extent in hilar CCA. J Gastroenterol Hepatol 25:286-292, 2010
- 215) Hemming AW, Mekeel K, Khanna A, et al.: Portal vein resection in management of hilar cholangiocarcinoma. J Am Coll Surg. 212:604-13 discussion 613-6, 2011
- 216) Nuzzo G, Giuliani F, Ardito F, et al.: Improvement in perioperative and long-term outcome after surgical treatment of hilar cholangiocarcinoma: results of an Italian multicenter analysis of 440 patients. Arch Surg. 147:26-34, 2012
- 217) Kiriya M, Ebata T, Aoba T, et al.: Prognostic impact of lymph node metastasis in distal cholangiocarcinoma. Br J Surg. 102:399-406, 2015
- 218) Wittekind C, Yamasaki S: Extrahepatic bile ducts - perihilar. In: Sobin LH, GospodarowiczMK, Wittekind C, editors. TNM classification of malignant tumours, 7th ed. Hoboken, NJ, USA: Wiley-Blackwell; p. 122–5, 2009
- 219) Miyazaki M, Yoshitomi H, Miyakawa S, et al.: Clinical practice guidelines for the management of biliary tract cancers 2015: the 2nd English edition. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 22:249-73, 2015
- 220) Ghouri YA, Mian I, Blechacz B: Cancer review: Cholangiocarcinoma. J Carcinog 14:1, 2015
- 221) Valle J, Wasan H, Palmer DH, et al: Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. N Engl J Med 362:1273-81, 2010
- 222) Cho SY , Kim SH, Park SJ et al: Adjuvant chemoradiation therapy in gallbladder cancer. J Surg Oncol. 1;102:8793, 2010
- 223) Lim KH , Oh DY, Chie EK et al: Adjuvant concurrent chemoradiation therapy (CCRT) alone versus CCRT followed by adjuvant chemotherapy: which is better in patients with radically resected extrahepatic biliary tract cancer?: a nonrandomized, single center study. BMC Cancer. 27;9:345, 2009

- 224) Gold DG , Miller RC, Haddock MG et al : Adjuvant therapy for gallbladder carcinoma: the Mayo Clinic Experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1;75:1505, 2009
- 225) Park JH , Choi EK, Ahn SD et al: Postoperative chemoradiotherapy for extrahepatic bile duct cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1;79:696704, 2011
- 226) Kim TH , Han SS, Park SJ et al: Role of adjuvant chemoradiotherapy for resected extrahepatic biliary tract cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*1;81, 2011
- 227) Takada T , Amano H, Yasuda H, et al: Is postoperative adjuvant chemotherapy useful for gallbladder carcinoma? A phase III multicenter prospective randomized controlled trial in patients with resected pancreaticobiliary carcinoma. *Cancer* 95:168595, 2002
- 228) Horgan AM, Amir E, Walter T, et al: Adjuvant therapy in the treatment of biliary tract cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 30:1934-40, 2012
- 229) Bonet Beltrán M, Allal AS, Gich I et al: Is adjuvant radiotherapy needed after curative resection of extrahepatic biliary tract cancers? A systematic review with a meta-analysis of observational studies. *Cancer Treat Rev* 8(2):111-9,2012
- 230) Ben-Josef E, Guthrie KA, El-Khoueiry AB, et al: SWOG S0809: A Phase II Intergroup Trial of Adjuvant Capecitabine and Gemcitabine Followed by Radiotherapy and Concurrent Capecitabine in Extrahepatic Cholangiocarcinoma and Gallbladder Carcinoma. *J Clin Oncol*, 2015
- 231) Lee S, Oh SY, Kim BG, et al: Second-line treatment with a combination of continuous 5-fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin-C (conti-FAM) in gemcitabine-pretreated pancreatic and biliary tract cancer. *Am J Clin Oncol* 32:348–52, 2009
- 232) Fuller CD, Dang ND, Wang SJ et al.: Image-guided intensity-modulated radiotherapy (IG-IMRT) for biliary adenocarcinomas: Initial clinical results. *Radiother Oncol.* 92:249-54, 2009
- 233) Woo Yi S, Ryong Kang D, Sik Kim K et al.: Efficacy of concurrent chemoradiotherapy with 5-fluorouracil or gemcitabine in locally advanced biliary tract cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014;73:191-98
- 234) Forner A, Llovet JM, Bruix J.: Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 379:1245-55,

2012

235) Kim JH, Won HJ, Shin YM et al.: Radiofrequency ablation for the treatment of primary intrahepatic cholangiocarcinoma. *AJR Am J Roentgenol.* 196:W205-9, 2011

236) Carrafiello G, Laganà D, Cotta E et al.: Radiofrequency ablation of intrahepatic cholangiocarcinoma: preliminary experience. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 33:835-9, 2010

237) Shen WF, Zhong W, Liu Q et al.: Adjuvant transcatheter arterial chemoembolization for intrahepatic cholangiocarcinoma after curative surgery: retrospective control study. *World J Surg.* 35(9):2083-91, 2011

238) Edwards A, Ray JC.: Transarterial therapies for unresectable cholangiocarcinoma: a meta-analysis. *J Vasc Interv Radiol* 23:S101, 2012

239) Kiefer MV, Albert M, McNally M et al.: Chemoembolization of intrahepatic cholangiocarcinoma with cisplatin, doxorubicin, mitomycin C, ethiodol, and polyvinyl alcohol: a 2-center study. *Cancer* 117:1498– 1505, 2011

240) Stuebs P, Habermann P, Garlipp B et al.: Developments of treatment of advanced intrahepatic cholangiocarcinoma: an analysis of systemic and local therapy modes in 57 patients. *J Clin Oncol* 30:abstr 356, 2012

241) European Association For The Study Of The Liver; European Organisation For Research And Treatment Of Cancer. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 56:908- 43, 2012

242) Cosimelli M, Golfieri R, Cagol P et al.: Multi-centre phase II clinical trial of Yttrium-90 resin microspheres alone in unresectable, chemotherapy refractory colorectal liver metastases. *Br J Cancer* 103: 324–331, 2010

243) Kennedy AS, Dezarn WA, McNeillie P, et al.: Radioembolization for unresectable neuroendocrine hepatic metastases using resin 90Y-microspheres: Early results in 148 patients. *Am J Clin Oncol* 31:271–279, 2008

244) Salem R, Lewandowski RJ, Atassi B, et al.: Treatment of unresectable hepatocellular carcinoma with use of 90Y microspheres (TheraSphere): Safety, tumor response, survival. *J Vasc Intervent Radiol* 16: 1627–1639, 2005

245) Ibrahim SM, Mulcahy MF, Lewandowski RJ et al.: Treatment of unresectable

cholangiocarcinoma using yttrium- 90 microspheres: results from a pilot study.

Cancer 113: 2119–2128, 2008

246) Saxena A, Bester L, Chua TC et al.: Yttrium-90 radiotherapy for unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma: a preliminary assessment of this novel treatment option. *Ann Surg Oncol* 17:484–491, 2010;

247) Hoffmann RT, Paprottka PM, Schon A et al.: Transarterial hepatic yttrium-90 radioembolization in patients with unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma: factors associated with prolonged survival. *Cardiovasc Intervent Radiol* 35:105–116, 2012

248) Rafi S, Piduru SM, El-Rayes B et al.: Yttrium-90 radioembolization for unresectable standard-chemorefractory intrahepatic cholangiocarcinoma: survival, efficacy, and safety study. *Cardiovasc Intervent Radiol* 36: 440–48, 2013

249) Bowling TE, Galbraith SM, Hatfield AR et al.: A retrospective comparison of endoscopic stenting alone with stenting and radiotherapy in non-resectable cholangiocarcinoma. *Gut* 39: 852–58, 1996

250) Leung JT, Kuan R: Intraluminal brachytherapy in the treatment of bile duct carcinomas. *Australian Radiology*, 41: 151–54, 1997

251) Takamura A, Saito H, Kamada T et al.: Intraluminal low-dose-rate ¹⁹²Ir brachytherapy combined with external beam radiotherapy and biliary stenting for unresectable extrahepatic bile duct carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57:1357-1365, 2003

252) Ghafoori AP, Nelson JW, Willett CG et al.: Radiotherapy in the Treatment of Patients with Unresectable Extrahepatic CCA. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 81:654-659, 2010

253) Yoshioka Y, Ogawa K, Oikawa H et al.: Impact of intraluminal brachytherapy on survival outcome for radiation therapy for unresectable biliary tract cancer: a propensity-score matched-pair analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 89:822-829, 2014

254) González D, Gouma DJ, Rauws EA et al.: Role of radiotherapy, in particular intraluminal brachytherapy, in the treatment of proximal bile duct carcinoma. *Ann Oncol* 10:215-220, 1999

- 255) Golfieri R, Giampalma E, Renzulli M et al.: Unresectable hilar CCA: multimodality approach with percutaneous treatment associated with radiotherapy and chemotherapy. *In Vivo* 20:757-760, 2006
- 256) Válek V, Kysela P, Kala Z et al.: Brachytherapy and percutaneous stenting in the treatment of CCA: a prospective randomised study. *Eur J Radiol* 62:175-179, 2007
- 257) Alden ME, Mohiuddin M.: The impact of radiation dose in combined external beam and intraluminal Ir-192 brachytherapy for bile duct cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 28:945-951.
- 258) Mosconi C, Renzulli M, Giampalma E et al.: Unresectable perihilar CCA: multimodal palliative treatment. *Anticancer Res* 33:2747-2753, 2013
- 259) Patt YZ, Jones DV Jr, Hoque A, et al: Phase II trial of intravenous fluorouracil and subcutaneous interferon alfa- 2b for biliary tract cancer. *J Clin Oncol* 14:2311–15, 1996
- 260) Ducreux M, Rougier P, Fandi A, et al: Effective treatment of advanced biliary tract carcinoma using 5- fluorouracil continuous infusion with cisplatin. *Ann Oncol* 9:653–56, 1998
- 261) Nehls O, Klump B, Arkenau HT, et al: Oxaliplatin, fluorouracil and leucovorin for advanced biliary system adenocarcinomas: a prospective phase II trial. *Br J Cancer* 87:702–04, 2002
- 262) Ducreux M, van Cutsem E, van Laethem JL, et al: A randomised phase II trial of weekly high-dose 5- fluorouracil with and without folinic acid and cisplatin in patients with advanced biliary tract carcinoma: results of the 40955 EORTC trial. *Eur J Cancer* 41:398-03, 2005
- 263) Rao S, Cunningham D, Hawkins RE, et al: Phase III study of 5FU, etoposide and leucovorin (FELV) compared to epirubicin, cisplatin and 5FU (ECF) in previously untreated patients with advanced biliary cancer. *Br J Cancer* 92:1650-54, 2005
- 264) Kim TW, Chang HM, Kang HJ, et al: Phase II study of capecitabine plus cisplatin as Wrst-line chemotherapy in advanced biliary cancer. *Ann Oncol* 14:1115–20, 2003
- 265) Hong YS, Lee J, Lee SC, et al: Phase II study of capecitabine and cisplatin in previously untreated advanced biliary tract cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 60:321-28, 2007
- Kim YJ, Im SA, Kim HG, et al: A phase II trial of S-1 and

cisplatin in patients with metastatic or relapsed biliary tract cancer. *Ann Oncol* 19:99-103, 2008

266) Raderer M, Hejna MH, Valencak JB, et al: Two consecutive phase II studies of 5-fluorouracil/leucovorin/mitomycin C and of gemcitabine in patients with advanced biliary cancer. *Oncology* 56:177-80, 1999

267) Valencak J, Kornek GV, Raderer M: Gemcitabine for the treatment of advanced biliary tract carcinomas: evaluation of two different dose regimens. *Onkologie* 22:498-01, 1999

268) Kubicka S, Rudolph KL, Tietze MK, et al: Phase II study of systemic gemcitabine chemotherapy for advanced unresectable hepatobiliary carcinomas. *Hepatogastroenterology* 48:783-89, 2001

269) Penz M, Kornek GV, Raderer M: Phase II trial of two-weekly gemcitabine in patients with advanced biliary tract cancer. *Ann Oncology* 12:183-86, 2001

270) Arroyo G, Gallardo J, Rubio B: Gemcitabine in advanced biliary tract cancer. Experience from Chile and Argentina in phase II trials. *Proc Am Soc Clin Oncol* 20:157a, 2001. Abstract 626

271) Lin MH, Chen JS, Chen HH, et al: A phase II trial of gemcitabine in the treatment of advanced bile duct and periampullary carcinomas. *Chemotherapy* 49(3):154-58, 2003

272) Tsavaris N, Kosmas C, Gouveris P, et al: Weekly gemcitabine for the treatment of biliary tract and gallbladder cancer. *Investigational New Drugs* 22:193-98, 2004

273) Park JS, Oh SY, Kim SH, et al: Single-agent gemcitabine in the treatment of advanced biliary tract cancers: a phase II study. *Jpn J Clin Oncol* 35:68-3, 2005

274) Okusaka T, Ishii H, Funakoshi A, et al: Phase II study of single-agent gemcitabine in patients with advanced biliary tract cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 57:647-53, 2006

275) Sasaki T, Isayama H, Nakai Y, et al: A randomized phase II study of gemcitabine and S-1 combination therapy versus gemcitabine monotherapy for advanced biliary tract cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 71:973-79, 2013

276) Valle J, Wasan H, Johnson P, et al: Gemcitabine alone or in combination with cisplatin in patients with advanced or metastatic cholangiocarcinomas or other biliary tract tumours: a multicentre randomised phase II study – the UK ABC-01 study. *Br J Cancer* 101:

621–27, 2009

277) Okusaka T, Nakachi K, Fukutomi A, et al: Gemcitabine alone or in combination with cisplatin in patients with biliary tract cancer: a comparative multicentre study in Japan. *Br J Cancer* 103:469-74, 2010

278) Santini D, Schiavon G, Vincenzi B, et al: Human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) levels predict response to gemcitabine in patients with biliary tract cancer (BTC). *Curr Cancer Drug Targets* 11:123-29, 2011

279) Murata A, Amano R, Yamada N, et al: Prognostic predictive values of gemcitabine sensitivity-related gene products for unresectable or recurrent biliary tract cancer treated with gemcitabine alone. *World J Surg Oncol* 11:117, 2013.

280) Verderame F, Russo A, Di Leo L, et al: Gemcitabine and oxaliplatin combination chemotherapy in advanced biliary tract cancer. *Ann Oncol* 17:68-2, 2006

281) Harder J, Riecken B, Kummer O, et al: Outpatient chemotherapy with gemcitabine and oxaliplatin in patients with biliary tract cancer. *Br J Cancer* 95:848-52, 2006

282) Manzione L, Romano R, Germano D: Chemotherapy with gemcitabine and oxaliplatin in patients with advanced biliary tract cancer: a single-institution experience. *Oncology* 73:311-15, 2007

283) André T, Reyes-Vidal JM, Fartoux L, et al: Gemcitabine and oxaliplatin in advanced biliary tract carcinoma: a phase II study. *Br J Cancer* 99:862-67, 2008

284) Wagner AD, Buechner-Steudel P, Moehler M, et al: Gemcitabine, oxaliplatin and 5-FU in advanced bile duct and gallbladder carcinoma: two parallel, multicentre phase-II trials. *Br J Cancer* 101:1846-52, 2009

285) Kim HJ, Lee NS, Lee SC, et al: A phase II study of gemcitabine in combination with oxaliplatin as first-line chemotherapy in patients with inoperable biliary tract cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 64:371-77, 2009

286) Hollebecque A, Bouché O, Romano O, et al: Experience of gemcitabine plus oxaliplatin chemotherapy in patients with advanced biliary tract carcinoma. *Chemotherapy* 56:234-38, 2010

287) Jang JS, Lim HY, Hwang IG, et al: Gemcitabine and oxaliplatin in patients with unresectable biliary cancer including gall bladder cancer: a Korean Cancer Study Group

phase II trial. *Cancer Chemother Pharmacol* 65:641- 47, 2010

288) Halim A, Ebrahim MA, Saleh Y: A phase II study of outpatient biweekly gemcitabine-oxaliplatin in advanced biliary tract carcinomas. *Jpn J Clin Oncol* 41:217-24, 2011

289) Lee J, Park SH, Chang HM, et al: Gemcitabine and oxaliplatin with or without erlotinib in advanced biliary- tract cancer: a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* 13:181-88, 2012

290) Valle J, Furuse J, Jitlal M, et al: Cisplatin and gemcitabine for advanced biliary tract cancer: a meta-analysis of two randomised trials. Epub 2014 May 19. *Ann Oncol* 25:391-98, 2014

291) Park I, Lee JL, Ryu MH et al: Prognostic factors and predictive model in patients with advanced biliary tract adenocarcinoma receiving first-line palliative chemotherapy. *Cancer* 115: 4148-55, 2009

292) Gruenberger B, Schueller J, Heubrandtner U, et al: Cetuximab, gemcitabine, and oxaliplatin in patients with unresectable advanced or metastatic biliary tract cancer: a phase 2 study. *Lancet Oncol* 11:1142–48, 2010

293) Malka D, Cervera P, Foulon S , et al: Gemcitabine and oxaliplatin with or without cetuximab in advanced biliary- tract cancer (BINGO): a randomised, open-label, non-comparative phase 2 trial. *Lancet Oncol* 15:819- 28, 2014

294) Lee J, Park SH, Chang HM, et al: Gemcitabine and oxaliplatin with or without erlotinib in advanced biliary- tract cancer: a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* 13:181-88, 2012

295) Zhu AX, Meyerhardt JA, Blaszkowsky LS, et al: Efficacy and safety of gemcitabine, oxaliplatin, and bevacizumab in advanced biliary-tract cancers and correlation of changes in 18-fluorodeoxyglucose PET with clinical outcome: a phase 2 study. *Lancet Oncol* 11: 48–4, 2010

296) Santoro A, Gebbia V, Pressiani T, et al: A randomized, multicenter, phase II study of vandetanib monotherapy versus vandetanib in combination with gemcitabine versus gemcitabine plus placebo in subjects with advanced biliary tract cancer: the VanGogh study. *Ann Oncol* 26:542-27, 2015

297) Lamarca A, Hubner RA, David Ryder W, et al: Second-line chemotherapy in

- advanced biliary cancer: a systematic review. *Ann Oncol* pii: mdu162, 2014
- 298) Lee S, Yong S, Kim BG, et al: Second-line treatment with a combination of continuous 5-fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin-C (Conti-Fam) in gemcitabine-pretreated pancreatic and biliary tract cancer. *Am J Clin Oncol* 32:348–52, 2009
- 299) Lim K, Han S, Oh D, et al: Outcomes of continuously infused 5-fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin-C (iFAM) as salvage regimen in patients with biliary tract cancer. *J Clin Oncol* 29:4 [abstr 282], 2011
- 300) Pino MS, Milella M, Gelibter A, et al: Capecitabine and celecoxib as second-line treatment of advanced pancreatic and biliary tract cancers. *Oncology* 76:254–61, 2009
- 301) Mane J, Iruarrizaga E, Rubio I, et al: Second-line chemotherapy with capecitabine and oxaliplatin in patients with pancreatic or biliary tree adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 29:4s [abstr 308], 2011
- 302) Sancho A, Ferreiro J, Mane J, et al: Oxaliplatin and capecitabine after gemcitabine failure in patients with advanced pancreatic, biliary, and gallbladder adenocarcinoma (APBC). *J Clin Oncol* 26:20s [abstr 15625], 2008
- 303) Fornaro L, Cereda S, Aprile G, et al: Multivariate prognostic factors analysis for second-line chemotherapy in advanced biliary tract cancer. *Br J Cancer* 110:2165–69, 2014
- 304) Abbas AK, Aster JC, Fausto N, Kumar V, Robbins J, Cotran R. *Le basi patologiche delle malattie*. Patologia generale. Milano, Edra LSWR spa, 2014
- 305) Giannini E, Borro P, Botta F, Chiarbonello B, Fasoli A, Malfatti F, Romagnoli P, Testa E, Risso D, Lantieri PB, Antonucci A, Boccato M, Milone S, Testa R. *Cholestasis is the main determinant of abnormal CA 19-9 levels in patients with liver cirrhosis*. *Int J Biol Markers*. 2000 Jul-Sep;15(3):226-30.
- 306) Weikang Wang, Yi Quan, Qibin Fu, Yu Liu, Ying Liang, Jingwen Wu, Gen Yang, Chunxiong Luo, Qi Ouyang, Yugang Wang *Dynamics between Cancer Cell Subpopulations Reveals a Model Coordinating with Both Hierarchical and Stochastic Concepts* Published: January 9, 2014

- 307) Vincenzo Cardinale, Maria Consiglia Bragazzi, Guido Carpino, Alessia Torrice, Yunfang Wang, Lola McAdams Reid, Eugenio Gaudio and Domenico Alvaro. *Cholangiocarcinomas: new insights from the discovery of stem cell niches in peribiliary glands of the biliary tree* *Advances in Hepatology*, Volume 2014 (2014), Article ID 794953, 10 pages
- 308) Cardinale, V. et al. *Mucin-producing cholangiocarcinoma might derive from biliary tree stem/progenitor cells located in peribiliary glands*. *Hepatology* 55, 2041–2042 (2012)
- 309) Carpino G, Cardinale V, Alvaro D et al. *Cells of origin and cancer stem cells in cholangiocarcinoma*. *Transl Gastrointest cancer* 2011, Nov 28
- 310) Carpino, G. et al. *Biliary tree stem/progenitor cells in glands of extrahepatic and intrahepatic bile ducts: an anatomical in situ study yielding evidence of maturational lineages*. *J. Anat.* 220, 186–199 (2012).
- 311) Cardinale, V. et al. *The biliary tree — a reservoir of multipotent stem cells*. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 231–240 (2012).
- 312) Arnold E. Reif and Joan M. V. Allen. *The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues*. *J Exp Med.* 1964 Sep 1; 120(3): 413–433.
- 313) Yamashita T1, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Hayashi T, Kondo M, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S. *Discrete nature of EpCAM+ and CD90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*. 2013 Apr;57(4):1484-97.
- 314) Bovio IM1, Allan RW. -*The expression of myeloid antigens CD13 and/or CD33 is a marker of ALK+ anaplastic large cell lymphomas*. *Am J Clin Pathol.* 2008 Oct;130(4):628-34.
- 315) Zhong Li. *CD133: a stem cell biomarker and beyond*. 2013; 2: 17. Published online 2013 Jul 1.
- 316) Kumar KK, Burgess AW, Gulbis JM. *Structure and function of LGR5: an enigmatic G-protein coupled receptor marking stem cells*. *Protein Sci.* 2014 May;23(5):551-65.
- 317) Kim MY et al (2009) Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell* 139(7):1315–1326
- 318) Gallivan M.V., Lokich J.J.: Carcinocythemia (carcinoma cell leukemia). Report of two cases with English literature review. *Cancer* 53:1100-2, 1984

- 319) Cristofanilli M., Budd G.T., Ellis M.J., et al: Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *New Engl J Med* 351:781-91, 2004
- 320) Zhang L., Riethdorf S., Wu G., et al: Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Cancer Res* 19:5701-5710, 2012
- 321) Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S., et al: Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 366:883-92, 2012
- 322) Nadal R., Fernandez A., Sanchez-Rovira P., et al: Biomarkers characterization of circulating tumour cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 14:R71, 2012
- 323) Sieuwerts A.M., Kraan J., Bolt J., et al: Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 101:61-6, 2009
- 324) Julich-Haertel H, Urban SK, Krawczyk M, et al. Cancer-associated circulating large extracellular vesicles in cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2017 Mar 6. pii: S0168-8278(17)30123-X.
- 325) Desitter I., Guerrouahen B.S., Benali-Furet N., et al: A New Device for Rapid Isolation by Size and Characterization of Rare Circulating Tumor Cells. *Anticancer Res* 31:427-441, 2011
- 326) Vona G., Sabile A., Louha M., et al: Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol* 156:57-63, 2000
- 327) Momburg F., Moldenhauer G., Hämmerling G.J., et al: Immunohistochemical Study of the Expression of a Mr 34,000 Human Epithelium-specific Surface Glycoprotein in Normal and Malignant Tissues. *Cancer Res* 47:2883-2891, 1987
- 328) Fehm T., Muller V., Aktas B., et al: HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial. *Breast Cancer Res Treat* 124:403-12, 2010
- 329) Giuseppe Gagliardi and Charles F. Bellows. *DCLK1 expression in gastrointestinal stem cells and neoplasia*; *Journal of Cancer Therapeutics & Research* ISSN 2049-7962
- 330) Naveen K.Neradugomma, Dharmalingam Subramaniam, Ossama W. Tawfik, Vincent Goffin, T.Rajendra Kumar, Roy A.Jensen and Shrikant Anant *Prolactin signaling enhances*

colon cancer stemness by modulating Notch signaling in a Jak2-STAT3/ERK manner,

Carcinogenesis vol.35 no.4 pp.795–806, 2014

331) Giuseppe Gagliardi, Monica Goswami, Roberto Passera, Charles F. Bellows. *DCLK1 immunoreactivity in colorectal neoplasia*. Clin Exp Gastroenterol. 2012; 5; 35-42

332) Guido Carpino, Vincenzo Cardinale, Paolo Onori, Antonio Franchitto, Pasquale Bartolomeo Berloco, Massimo Rossi, Yunfang Wang, Rossella Semeraro, Maurizio Anceschi, Roberto Brunelli, Domenico Alvaro, Lola M. Reid, and Eugenio Gaudio. *Biliary tree stem/progenitor cells in glands of extrahepatic and intrahepatic bile ducts: an anatomical in situ study yielding evidence of maturational lineages* J Anat . 2012 February ; 220(2): 186–199

333) Weygant N, Qu D, Berry WL, May R, Chandrakesan P, Owen DB, Sureban SM, Ali N, Janknecht R, Houchen CW *Small molecule kinase inhibitor LRRK2-IN-1 demonstrates potent activity against colorectal and pancreatic cancer through inhibition of doublecortin-like kinase 1*. Mol Cancer. 2014 May 6;13:103

334) Jang JD et al: Circulating tumor cells are associated with poor overall survival in patients with cholangiocarcinoma. Hepatology, 2015 June 19

335) Cardinale V, Renzi A, Carpino G, Torrice A, Bragazzi MC, Giuliente F, DeRose AM, Fraveto A, Onori P, Napoletano C, Franchitto A, Cantafora A, Grazi G, Caporaso N, D'Argenio G, Alpini G, Reid LM, Gaudio E, Alvaro D. *Profiles of cancer stem cell subpopulations in cholangiocarcinomas*. Am. J. Pathol. 185, 1724–1739 (2015)

336) Mirzaei A, Madjd Z, Kadijani AA, Tavakoli-Yaraki M, Modarresi MH, Verdi J, Akbari A, Tavoosidana G *Evaluation of circulating cellular DCLK1 protein, as the most promising colorectal cancer stem cell marker, using immunoassay based methods*. Cancer Biomark. 2016 Sep 26;17(3):301-311.

337) Weygant N, Qu D, Berry WL, May R, Chandrakesan P, Owen DB, Sureban SM, Ali N, Janknecht R, Houchen CW *Small molecule kinase inhibitor LRRK2-IN-1 demonstrates potent activity against colorectal and pancreatic cancer through inhibition of doublecortin-like kinase 1*. Mol Cancer. 2014 May 6;13:103

338) Ali N, Chandrakesan P, Nguyen CB, Husain S, Gillaspay AF, Huycke M, Berry WL, May R, Qu D, Weygant N, Sureban SM, Bronze MS, Dhanasekaran DN, Houchen CW.

Inflammatory and oncogenic roles of a tumor stem cell marker doublecortin-like kinase (DCLK1) in virus-induced chronic liver diseases Oncotarget. 2015 Aug 21;6(24):20327-44.

339) Joshua Whorton, Sripathi M. Sureban, Randal May, Dongfeng Qu, Stan A. Lightfoot, Mohammad Madhoun, Milton Johnson, William M. Tierney, John T. Maple, Kenneth J. Vega, Courtney W. Houche. *DCLK1 Is Detectable in Plasma of Patients with Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma*. Dig Dis Sci (2015) 60:509–513

340) Hiromitsu Ito, Shinji Tanaka, Yoshimitsu Akiyama¹, Shu Shimada, Rama Adikrisna, Satoshi Matsumura, Arihiro Aihara, Yusuke Mitsunori, Daisuke Ban, Takanori Ochiai, Atsushi Kudo, Shigeki Arii, Shoji Yamaoka, Minoru Tanabe. *Dominant Expression of DCLK1 in Human Pancreatic Cancer Stem Cells Accelerates Tumor Invasion and Metastasis* PLoS One. 2016 Jan 14;11(1): 1-19

341) Sureban S., Randal M., Dongfeng Q., *DCLK1 Regulates Pluripotency and Angiogenic Factors via microRNA-Dependent Mechanisms in Pancreatic Cancer* PLoS one. 2013 Sept 9; 8:10

342) Wang W, Zhang H, Wang L, Zhang S, Tang M *miR-613 inhibits the growth and invasiveness of human hepatocellular carcinoma via targeting DCLK1*. Biochem Biophys Res Commun. 2016 May 13;473(4):987-92

343) Naushad Ali, Parthasarathy Chandrakesan¹, Charles B. Nguyen¹, Sanam Husain, Allison F. Gillaspay, Mark Huycke, William L. Berry, Randal May, Dongfeng Qu, Nathanie Weygant, Sripathi M. Sureban, Michael S. Bronze, Danny N. Dhanasekaran and Courtney W. Houchen *Inflammatory and oncogenic roles of a tumor stem cell marker doublecortin-like kinase (DCLK1) in virus-induced chronic liver diseases*, Oncotarget, April 2015.

344) Cohen, Punt, Iannotti et al. (2008). Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol; 26(19):3213–3221.

345) Gazzaniga, Raimondi, Gradilone et al. (2013). Circulating tumor cells in metastatic colorectal cancer: do we need an alternative cutoff? J Cancer Res Clin Oncol; 139(8):1411–1416.