

Fattori prognostici predittivi di metastatizzazione linfonodale del carcinoma squamocellulare della laringe

Prognostic patterns for predicting lymph node metastasis in patients with squamous cell carcinoma of the larynx

F. Ricciardiello¹, G. Petruzzi¹, G. Misso², T. Abate¹, E. Oliva¹, E. Cantone¹, M. Mesolella¹

¹ Dipartimento Testa collo, UOC Otorinolaringoiatria, AOU Policlinico Federico II, Napoli

² Dipartimento di Biochimica, Biofisica e Patologia Generale, Seconda Università degli Studi di Napoli

³ UOC Otorinolaringoiatria, AORN Cardarelli, Napoli

Abstract

Il carcinoma squamocellulare della laringe (LSCC) rappresenta circa il 2% di tutti i tumori. La presenza di metastasi linfonodali laterocervicali è il fattore prognostico più importante. Ad oggi il fattore prognostico ideale ed unico per la metastatizzazione linfonodale nel carcinoma laringeo non esiste. È di fondamentale importanza identificare i diversi fattori prognostici di metastatizzazione linfonodale in grado di fornire informazioni affidabili sul comportamento biologico della neoplasia, in grado di implementare il TNM e coadiuvare l'equipe medica nella scelta della più adeguata strategia terapeutica.

Introduzione

Di seguito discutiamo fattori prognostici legati al paziente e fattori prognostici interni al tumore.

Il carcinoma squamocellulare della laringe (LSCC) rappresenta circa il 2% di tutti i tumori¹, con un'incidenza stimata nel 2012 di 39,9 nuovi casi su 100.000 abitanti, ed un rapporto maschio: femmina pari a 8,8: 0,8 (9: 0,7 in Italia)². È considerato, per incidenza, la neoplasia di più frequente riscontro dell'apparato respiratorio, dopo il carcinoma polmonare (Tab.1).

La mortalità stimata per il LSCC è pari a 19,8 casi/100.000 nel 2012 in Europa, con rapporto maschio: femmina pari a 4,3: 0,3 (3,3: 0,8 in Italia)².

La sopravvivenza specifica per malattia del

Abstract

Squamous cell carcinoma of the larynx (LSCC) represents approximately 2% of all tumors. The involvement of metastatic cervical lymph nodes has the major negative prognostic impact. Researching new factors with prognostic significance is indispensable. Patterns for predicting metastasis improves TNM classification, helping medical equipe and releasing information with tumor behavior and surgical indication.

Introduction

We discuss prognostic patterns related to patient and prognostic patterns related to tumor.

Squamous cell carcinoma of the larynx (LSCC) represents approximately 2% of all tumors¹.

It is clearly related to the abuse of tobacco and alcohol. The incidence of this tumour is approximately 39,9 new cases per 100.000 inhabitants in 2012. Most of these patients are men: man/woman ratio is 8,8:0,8 (9,0:0,7 in Italy). It is considered to be the most common malignant tumor of respiratory tract, preceded by the lung cancer (Tab.1).

In 2012, mortality estimated for LSCC is 19,8/100.000 in Europe, with a man/woman ratio: 4,3:0,3 (3,3:0,8 in Italy)².

Several factors determine the global survival of patients with tumors of the larynx. The involvement of metastatic cervical lymph nodes has the major negative prognostic impact.

The rate of patients alive after 2 years of follow-up, based on pN analysis was 88,1% for the pN0 group, 16,2% for the N⁺^{3,4}.



Sede	Uomini		Donne	
	Tasso di incidenza grezzo/100.000 abitanti		Tasso di incidenza grezzo/100.000 abitanti	
Lingua	3.6	(10%)	1.2	(18%)
Bocca	4.4	(12%)	1.6	(24%)
Ghiandole salivari	1.2	(3%)	0.8	(12%)
Orofaringe	3.1	(8%)	0.7	(10%)
Ipfaringe	2.2	(6%)	0.4	(6%)
Rinofaringe	1.3	(4%)	0.5	(7%)
Faringe non specificata	0.8	(2%)	0.2	(3%)
Laringe	19.8	(54%)	1.5	(22%)
Testa e collo	36.5	(100%)	6.8	(100%)

Tab.1. Tumori maligni del distretto Testa Collo in Italia (dati: ISS).

Tab.1. Incidence of malignant tumour of the head and neck. (ISS data report).

cancre della laringe è condizionata da molteplici fattori; la presenza di metastasi linfonodali laterocervicali rappresenta il singolo fattore prognostico più importante^{3,4}. La sopravvivenza a 2 anni nei pazienti pN+ decresce del 40-50% (88.01% nei pN0 vs 41.54% nei pN+)⁴.

In base a tali premesse appare chiara l'importanza di identificare fattori prognostici di metastatizzazione linfonodale in grado di fornire informazioni affidabili sul comportamento biologico della neoplasia, in grado di implementare il TNM e coadiuvare l'equipe medica nella scelta della più adeguata strategia terapeutica.

Si possono definire prognostici quei fattori che sono in grado di farci prevedere il futuro della neoplasia su basi scientifiche oggettivamente validate.

Ad oggi il fattore prognostico ideale ed unico per la metastatizzazione linfonodale nel carcinoma laringeo non esiste. Utili informazioni provengono dalla valutazione clinica, dall'esame anatomo-patologico e dagli studi tissutali postchirurgici, dai dati raccolti nell'inquadramento iniziale della patologia ed in ultima istanza dal follow-up clinico e radiodiagnostico postoperatorio. Si tratta di un insieme di fattori che possono guidare la scelta terapeutica. Persiste tuttavia una notevole confusione riguardo alla loro integrazione mediante precisi algoritmi prognostici o possibili applicazioni routinarie in ambito clinico. Non è sempre chiaro quale indicazione sia la più corretta, quale test debba essere eseguito, quale informazione

Researching new factors with prognostic significance is indispensable. Patterns for predicting metastasis improves TNM classification, helping medical equipe and releasing information with tumor behavior and surgical indication.

Prognostic factors must be based on objectively validated scientific studies.

To date, the only and ideal prognostic factor for lymphnode metastasis in laryngeal carcinoma doesn't exist. Useful information come from clinical evaluation, post-surgical analysis, histological examination, clinical follow-up and from radiodiagnostic exam. It deals with a series of factors which can guide the therapeutic choice. Yet, a remarkable confusion persists in their integration by precise prognostic algorithms or by routine possible applications in clinical environment. It is hard to determine which indication is the most correct one, which test needs to be done, which information may mainly influence the therapy or which histopathological request may be used for prognostic objectives without causing an excessive waste of funds⁵.

Prognostic patterns for predicting lymphnode metastasis are divided into:

- Patterns related to patient
- Patterns related to neoplasm
- Patterns related to therapy

Materials e methods

1. Prognostic patterns related to patient

These are considered to be "consolidated" patterns for the total course of neoplastic pathology and they express a minor or a major tendency to lymphnode spread.



possa influire maggiormente sulla terapia, o quale richiesta anatomopatologica possa essere utilizzata a fini prognostici senza un eccessivo spreco di risorse^{5,6}.

I fattori prognostici predittivi di metastatizzazione linfonodale sono così suddivisi:

- Fattori legati al Paziente;
- Fattori legati alla Neoplasia;
- Fattori legati alla Terapia;

Materiali e metodi

1. Fattori prognostici legati al paziente

Sono sicuramente fattori «consolidati» per il decorso complessivo della patologia neoplastica e quindi anche espressione di una maggiore o minore tendenza alla diffusione linfonodale

- **ETÀ:** In numerosi studi l'età avanzata si è rivelata fattore prognostico negativo, infatti nei pazienti anziani sono più frequenti comorbidità (sicuramente prognostiche) che condizionano il decorso della malattia⁷.
- **SESSO:** Il sesso può essere considerato un sicuro fattore di rischio (il sesso maschile è colpito circa 5 volte più del sesso femminile), ma non un fattore prognostico^{5,8}.
- **ABITUDINI DI VITA:** Il permanere, a malattia insorta, di abitudini voluttuarie (es. fumo e alcool) sicuramente a rischio carcinogenetico, o il mantenimento di attività lavorative a rischio sono sicuramente fattori prognostici negativi⁹.
- **STATO NUTRIZIONALE:** Uno scadimento nutrizionale dovuto all'ipoalimentazione o a fenomeni cachettici di origine neoplastica, si correla con un aumento della progressione e diffusione tumorale. Numerosi studi correlano l'indice di Karnofsky KI (indice di performance status) con deficit immunitari che riguardano gli elementi effettori delle difese contro il tumore (T linfociti citotossici, cellule NK, cellule APC)⁵.
- **PATOLOGIE CONCOMITANTI:** Numerosi studi hanno dimostrato che la comorbidità (riguardante soprattutto le broncopatie croniche e le epatopatie croniche) è un sicuro fattore prognostico negativo sulla sopravvivenza. In uno studio dell'«Health

- **AGE:** Numerous studies show that advanced age is a negative prognostic factor, since older patients are prone to more frequent comorbidities that influence the disease course⁷.
- **GENDER:** Gender can be considered to be a certain risk factor (male gender is affected about 5 times more than the female one), but it can't be considered to be a prognostic factor^{5,8}.
- **HABITS/LIFESTYLE:** Certainly, negative prognostic factors are: persisting, when the disease has already arisen, in unnecessary habits (ex: cigarettes and alcohol) surely at carcinogenetic risk or (persisting) in doing working activities at risk⁹.
- **NUTRIATIONAL STATUS:** Nutrition decline, due to hyperalimentation or to cachectical phenomenons from neoplastic origin, is correlated to an increase of tumor progression and spread. Numerous studies correlate KI Karnofsky Index (performance status index) to immune deficits concerning effector elements of tumor defenses (cytotoxic T-lymphocyte, NK cells, APC cells)⁵.
- **COMORBILITIES:** Numerous studies have shown that comorbidity (with a special regard to chronic bronchopathy and chronic hepatopathy) is a certain negative prognostic factor about survival. A "Health Care Finance Administration" (HCFA) study on 9386 patients have shown that, poor nutritional status and comorbidity represent very important negative prognostic factors^{10,11}.
- **POST-SURGICAL COMPLICATIONS:** Post-surgical complications presence is correlated to a more unfavourable decline of the disease. It can be supposed that the main care of immune system in facing flogistic complication may cause a fall of tumor immune surveillance¹².
- **DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC DELAY:** Since diagnostic delay, then therapeutic, is unfavourable for patient's survival and healing, it is a matter of fact: a diagnosed neoplasm at more advanced stage has minor possibilities to be healed¹³.



Care Finance Administration» (HCFA) su 9386 pazienti è stato dimostrato, con il metodo di Cox, che stato nutrizionale scadente e comorbidità sono fattori prognostici negativi molto significativi^{10,11}.

- **COMPLICANZE POST OPERATORIE:** La presenza di complicanze post operatorie si correla con un decorso più sfavorevole della malattia. Si può ipotizzare come il maggiore impegno del sistema immunitario a fronteggiare la complicanza flogistica, possa essere causa di una «caduta» dell'immunosorveglianza verso il tumore¹².
- **RITARDO DIAGNOSTICO E TERAPEUTICO:** Che il ritardo diagnostico, e quindi terapeutico, sia sfavorevole alla sopravvivenza e alla guarigione del paziente, è dato quasi assiomatico: una neoplasia diagnosticata in stadio più avanzato ha minori probabilità di guarigione¹³.

2. Fattori prognostici intrinseci al tumore

• Sede della neoplasia primitiva

L'anatomia del drenaggio linfatico laringeo rappresenta la base anatomica sulla quale si fonda la netta discrepanza di rischio di metastatizzazione linfonodale per le diverse sedi del Carcinoma della laringe. La rete linfatica laringea è costituita da due aree separate tra di loro, corrispondenti alle regioni sopraglottica e sottoglottica; l'area glottica è notoriamente povera di vasi linfatici e questo contribuisce a che questo segmento abbia funzione di barriera e rende conto della rarità di metastatizzazione dei carcinomi contenuti entro la glottide. Il sistema linfatico sopraglottico è molto sviluppato in particolare a livello delle pliche ariepiglottiche ed è in comunicazione con il segmento sottoglottico lungo la parete posteriore della laringe. Le vie linfatiche laringee per ciascun area formano una rete sottomucosa profonda ed una mucosa superficiale, quest'ultima meno ricca di quella sottomucosa, tra loro ampiamente connesse. La rete linfatica sottomucosa è maggiormente sviluppata nella regione sovraglottica. In corrispondenza delle pliche ari-epiglottiche i vasi linfatici si

2. Prognostic patterns related to tumour

• PRIMITIVE NEOPLASM AREA

Laryngeal lymphatic drainage represents the anatomic base on which the clear discrepancy of lymphnode metastasis risk for different areas of larynx carcinoma is founded.

Laryngeal lymph system is composed of two areas separated from each other, corresponding to supraglottic and subglottic region; the glottis area generally lacks of lymphatic vessels and this evaluates the rarity of carcinoma metastasis into the glottis. Supraglottic lymph system is very developed especially at aryepiglottic folds level and it communicates to the subglottic segment on the larynx posterior wall. Laryngeal lymph system form, in each area, a deep submucous system and a superficial one, (the latter is less rich than the submucous one), which are extremely connected to each other. Submucous lymph system is more developed in supraglottic region. Similarly to aryepiglottic folds, lymphatic vessels occur in association with collectors that cross thyrohyoid membrane with vessels and nerves of the superior laryngeal peduncle; from here, collectors go three ways: the main one goes towards the submandibular triangle to drain either Kuttner or Chassaignac or submandibular lymphnode; another collector goes towards the thyrocervical trunk to each internal jugular vein chain; finally, a third trunk directly drains the ganglions on the above-mentioned chain.

Glottic lymphatic system is composed of fine and weak vessels which simultaneously go towards vocal chords whose density reduces gradually in approaching to the free border. Glottis lymphatics drain peduncle in Delphic lymphnode. Subglottis lymphatics form three collectors: an anterior one and two posterior lateral ones. The anterior one crosses the cricothyroid membrane and flows into the delphic lymphnod, from here, it partially goes towards pre-tracheal lymphnodes and partially towards lateral internal jugular vein lymphnodes by passing over the thyroid gland. Posterior lateral collectors cross the cricothyroid ligament and, by passing below the thyroid, they go towards recurrent lymphnodes and later towards the mediastinal ones. According to this foreword, it is clear why, at glottis level, there is a low incidence of lymphnode metastasis, vice versa, lymphnode metastasis risk,



riuniscono in collettori che attraversano la membrana tiro-ioidea assieme ai vasi e ai nervi del peduncolo laringeo superiore; da qui i collettori seguono tre vie: la principale si dirige verso il triangolo sottodigastrico per drenare nel linfonodo di Kuttner o Chassaingnac o sottodigastrico; un altro collettore prende la via del tronco tiroo-linguo-facciale per raggiungere la catena della vena giugulare interna; infine un terzo tronco drena direttamente nei gangli disposti lungo la catena suddetta. La rete linfatica glottica è costituita da vasi fini ed esili diretti parallelamente alle corde vocali la cui densità diminuisce man mano che ci si avvicina al bordo libero. I linfatici glottici drenano attraverso il peduncolo mediano intercrico-tiroideo nel linfonodo delfico. I linfatici sottoglottici si riuniscono anche essi a formare tre collettori: uno anteriore e due postero-laterali. L'anteriore attraversa la membrana crico-tiroidea e confluisce nel linfonodo delfico da cui si dirige in parte verso i linfonodi pretracheali e in parte lateralmente ai linfonodi della giugulare interna passando al di sopra della ghiandola tiroidea. I collettori postero-laterali attraversano il legamento crico-tracheale e, passando al di sotto della tiroide, si dirigono ai linfonodi ricorrenziali e successivamente a quelli mediastinici. In base a tali premesse si comprende perché a livello glottico vi è una bassa incidenza di metastasi linfonodali, viceversa, il rischio di metastatizzazione, anche negli stadi iniziali del T, è notevolmente più accentuato per le sedi sopraglottica e ipofaringea, (dal 30 al 90% delle neoplasie di queste sedi presentano linfonodi positivi per metastasi)^{6, 6, 14}.

• Istotipo

Il 95% delle neoplasie maligne della laringe è costituito da Carcinomi squamocellulare (Fig.1)⁶.

Varianti meno frequenti del carcinoma cellulare sono:

- Carcinoma Verrucoso;
- Carcinoma a cellule squamose Basaloide;
- Carcinoma a cellule squamose Papillare;
- Carcinoma Sarcomatoide o a cellule fusiformi;
- Carcinoma a cellule squamose acantolitico;

even at T initial stage, is considerably more accentuated in supraglottis and hypopharynx region, (from 30 up to 90% of neoplasms in these regions present lymphodes positive for metastasis'^{6, 11}.

• HISTOLOGICAL CLASSIFICATION

Squamous cell carcinoma (SCC) is the most common malignancy of the larynx. It represents 95% of all larynx tumours⁶ (Fig.1).



Fig.1. Carcinoma Squamocellulare della Laringe (Fonte: Pathology & Genetics Head and Neck Tumours, WHO/IARC, Lyon 2005) / Fig.1. Squamous cell Carcinoma of larynx. (Data: Pathology & Genetics Head and Neck Tumours, WHO/IARC, Lyon 2005)

Other less frequent variants of this kind of tumours are:

- Verrucous Carcinoma;
- Basaloid squamous cell carcinoma;
- Papillary squamous cell carcinoma;
- Spindle cell carcinoma;
- Acantholytic squamous cell carcinoma;
- Adenosquamous carcinoma.

Cellular and structural morphological difference implies different biological behavior.

Verrucous carcinoma: Verrucous carcinoma (VC) is a nonmetastasizing variant of well-differentiated squamous cell carcinoma (SCC) characterized by an exophytic, warty, slowly growing neoplasm with pushing margins. It is also called Ackerman tumour. Is characterized by a slow, locally invasive growth causing extensive local destruction if left untreated. Pure Verrucous carcinoma has an excellent prognosis; the reported five year survival rate for laryngeal is 85-95%^{13, 16, 17}.

Basaloid squamous cell carcinoma: Basaloid squamous cell carcinoma (BSCC) is an aggressive, high-grade, variant of SCC composed of both



- Carcinoma Adenosquamoso.

La differenza morfologica sia cellulare che strutturale sottende mutazioni e comportamento biologico diverso. L'aggressività della neoplasia e la capacità di infiltrazione locale e/o di metastatizzazione linfonodale sono pertanto espressione della alterazione genotipica della singola mutazione, del singolo istotipo, della singola neoplasia.

Carcinoma verrucoso: Il carcinoma verrucoso è la variante ben differenziata del carcinoma squamocellulare.

Anche definito tumore di Ackerman, è una neoplasia non metastatizzante, a crescita esofitica e verrucosa. È un tumore a lenta crescita e localmente aggressivo. Si riscontra prevalentemente nella glottide^{15, 16, 17}.

Carcinoma a cellule squamose Basaloide: Il carcinoma a cellule squamose basaloide è una variante aggressiva, di alto grado e caratterizzato istologicamente dalla presenza di cellule sia squamose che basaloidei. I seni piriformi e la parte sovraglottica della laringe sono la più comune sede di presentazione. È un tumore aggressivo, a rapida crescita e prognosi infausta. Al momento della diagnosi già i due terzi dei pazienti presentano coinvolgimento linfonodale regionale con metastasi a distanza interessanti polmoni, ossa, cute e cervello nel 35-50% dei pazienti^{18, 19, 20}.

Carcinoma a cellule squamose Papillare: Il carcinoma a cellule squamose papillare è una variante a crescita esofitica, aspetto papillare e prognosi favorevole. La laringe e l'ipofaringe sono le più comuni sedi di sviluppo. Macroscopicamente si presenta soffice, friabile e di aspetto polipoide. Le papille sono costituite da un core fibrovascolare ricoperto da cellule neoplastiche simil basaloidei immature e pleomorfe. La prognosi migliore è probabilmente conseguenza di una limitata capacità infiltrativa^{21, 22, 23, 24, 25}.

Carcinoma Sarcomatoide: Il carcinoma sarcomatoide o Carcinoma a cellule fusiformi è un tumore bifasico composto di cellule neoplastiche squamose ed una componente di cellule maligne fusiformi che, sebbene abbiano un aspetto mesenchimale, sono di origine epite-

basaloide e squamose componenti. The pyriform sinus and supraglottic larynx are the usual sites of involvement. BSCC is an aggressive, rapidly growing tumour characterised by an advanced stage at the time of diagnosis and a poor prognosis. Metastases to the regional lymph nodes have been reported in two thirds of patients and distant metastases involving lungs, bone, skin and brain, in 35-50% of patients^{15, 16, 20}.

Papillary squamous cell carcinoma: Papillary squamous cell carcinoma (PSCC) is a distinct variant of SCC characterized by an exophytic, papillary growth, and a favourable prognosis. The larynx and the hypopharynx are among the most common sites of involvement. PSCC presents as a soft, friable, polypoid, exophytic, papillary tumour. The tumour is characterized by a predominant papillary growth pattern. These papillae have thin fibrovascular cores covered by neoplastic, immature basaloid cells or more pleomorphic cells. Metastases to the regional lymph nodes may be presented, but distant metastases are rare. Patients with PSCC are generally believed to have a better prognosis than those with SCC. The better prognosis is probably related to limited invasion^{21, 22, 23, 24, 25}.

Sarcomatoid carcinoma: Sarcomatoid carcinoma or Spindle cell carcinoma (SPCC) is a biphasic tumour composed of a squamous cell carcinoma, either in-situ and/or invasive, and a malignant spindle cell component with a mesenchymal appearance, but of epithelial origin. The surface is frequently ulcerated. This variant metastasizes to the regional lymph nodes in up to 25% of cases; but distant dissemination is less common. Favourable prognostic features are: low stage, polypoid rather than endophytic growth, a glottic site of origin, relatively shallow depth of sarcomatoid process, and absence of prior radiation^{26-27, 28, 29}.

Acantholytic squamous cell carcinoma: This is an uncommon histopathologic variant of squamous cell carcinoma, characterised by acantholysis of the tumour cells, creating pseudolumina and false appearance of glandular differentiation. It rarely arises in the supraglottic larynx. Some reports suggest a more aggressive behavior^{30, 31}.

Adenosquamous carcinoma: Adenosquamous carcinoma is rare aggressive neoplasm originates from the surface epithelium and is characterized



liale; macroscopicamente la superficie appare spesso ulcerata. La capacità di metastatizzazione linfonodale è elevata (il 25% dei carcinomi sarcomatoidi è N+ al momento della diagnosi) mentre la disseminazione a distanza è meno comune. Sebbene sia globalmente considerato una variante a prognosi peggiore rispetto al comune carcinoma squamo cellulare, può tuttavia avere un positivo responso in termini di sopravvivenza se diagnosticato in stadio basso, crescita polipoide piuttosto che endofitica, sede di origine glottica, scarsa profondità dell'infiltrazione sarcomatoide^{26, 27, 28, 29}.

Carcinoma a cellule squamose Acanolitico: Il carcinoma a cellule squamose acantolitico è una variante rara e poco comune, caratterizzata da acantolisi delle cellule tumorali che forma degli pseudolumen intratumorali ed una falsa apparenza di differenziazione ghiandolare. La sede più frequente di insorgenza, seppur rara, è a livello sopraglottico. Ha un comportamento maggiormente aggressivo rispetto al carcinoma squamocellulare classico^{30, 31}.

Carcinoma Adenosquamoso: Il carcinoma adenosquamoso è una rara ed aggressiva neoplasia caratterizzata dalla contemporanea presenza di cellule squamose e dalla contemporanea presenza di adenocarcinoma de-differenziato dalla superficie dell'epitelio. È una neoplasia molto aggressiva che alla diagnosi è già in stadio elevato, con il 75% dei pazienti che presentano linfonodi regionali e nel 25% anche metastasi a distanza in particolar modo a livello polmonare. L'aspettativa di vita alla diagnosi è di circa 23 mesi^{32, 33}.

• Grading

Il Grading, o grado di differenziazione tumorale, è una valutazione tissutale anatomopatologica basata su uno score identificato sia in base alla capacità macroscopica della neoplasia di organizzarsi a formare tessuti macroscopicamente riconoscibili, sia su parametri citologici come descritti da Blackwell et al.: polarità rispetto alla lamina propria, numero di mitosi nel terzo medio superficiale dell'epitelio e presenza di figure mitotiche anormali, pleomorfismo e maturazione cellulare, anomalie dei nuclei, infiammazione stromale³⁴.

by both squamous cell carcinoma and true adenocarcinoma. This tumour is reported as being more aggressive than SCC. In a recent review, 75% of patients had regional lymph node metastases, and 25% of patients had distant metastases, most commonly to the lungs. The reported 5-year survival rate is 15-25%. Half of the patients die of disease after a mean of 23 months (range 12-35 months)^{32, 33}.

• GRADING

Grading, or tumor differentiation grade, is a tissue evaluation based on an identified score both on the macroscopic ability of neoplasm in order to form macroscopic recognizable tissues and on cytological parameters as Blackwell et. al describe: polarity compared to lamina propria, number of mitosis in third superficial medium of epithelium and the presence of abnormal mitotic figures, pleomorphism and cell maturation, nucleus anomalies and stromal inflammation³⁴.

The used values are: G1, well-differentiated, G2, moderately differentiated, G3, poorly differentiated. Specifically, a well-differentiated squamous cell carcinoma reminds normal squamous epithelial tissue producing keratin and a variable number of "pearls" composed of the aggregation of keratin. Moderately differentiated forms are identified by nuclear pleomorphism and visible mitotic activity with abnormal mitosis and a minor keratinization. Finally, poorly differentiated carcinomas see prevailing immature cells, innumerable mitosis and a poor or missing production of keratin.

Even now, grading proves to be one of the most used factors: it connects the biological data, expressing the tumor morphology and the disorder of neoplasm, to prognostic data: high grade neoplasms present an increased risk of lymphatic metastasis^{34, 35}.

• TNM

The prognostic impact about risking lateral-cervical metastasis in squamous head and neck carcinoma is strictly associated with T extension, which proves to be the most important and significant prognostic factor in lymphnode metastasis (Tab.2).

Lymphnode metastasis risk is much worse in advanced stages (T3-T4) than in the initial ones (T1-T2) in which N is equal to 0³⁷.



I valori utilizzati sono G1, ben differenziato, G2, moderatamente differenziato, G3, scarsamente differenziato.

Nello specifico un carcinoma squamocellulare ben differenziato ricorda il normale tessuto squamoso epiteliale con produzione di cheratina ed un numero variabile di "perle" formate dall'aggregazione di quest'ultima. Le forme moderatamente differenziare sono distinguibili dal pleomorfismo nucleare e dalla visibile attività mitotica con mitosi anormali ed una minor cheratinizzazione. Infine i carcinoma poco differenziati vedono predominare cellule immature, innumerevoli mitosi ed una scarsa od assente produzione di cheratina^{35, 36}.

Il Grading risulta tuttora uno dei fattori più utilizzati: correla il dato biologico espressione della morfologia tumorale e della disorganizzazione della neoplasia, al dato prognostico: le neoplasie di grado elevato presentano un rischio di metastatizzazione linfatica aumentato.

• TNM

L'impatto prognostico sul rischio di metastatizzazione latero-cervicale nei carcinomi squamosi del distretto testa-collo è strettamente associato all'estensione di T, che risulta essere il più importante e significativo fattore prognostico di metastatizzazione linfonodale (Tab.2).

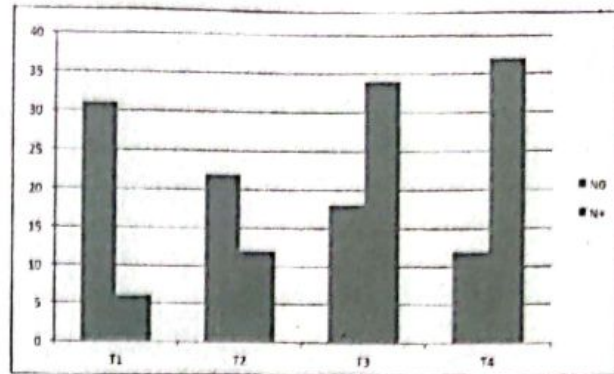
Il rischio di metastasi linfonodali è significativamente peggiore per gli stadi avanzati (T3-T4) rispetto agli stadi iniziali (T1-T2) quando N sia pari a 0³⁷.

• Margini della neoplasia

Il fronte di invasione tumorale può essere distinto in due forme: un pattern espansivo ed un pattern infiltrativo.

La crescita espansiva è caratterizzata da larghe isole tumorali periferiche con margini ben definiti ed in netta continuità con la neoplasia primitiva. Tale crescita è associata ad una prognosi migliore.

Un pattern di crescita infiltrativo, è caratterizzato dalla presenza di cellule tumorali singole o organizzate in cordoni cellulari piccoli ed irregolari, con margini infiltrativi mal definiti. Si associa ad un decorso maggiormente aggressivo³⁸.



Tab. 2. Casistica e dati UOC Otorinolaringoiatria AOU Federico II: Rapporto Estensione tumorale T e metastatizzazione linfonodale N.

Tab.2. Data: UOC Otorinolaringoiatria AOU Federico II: T/N+ Ratio.

• NEOPLASM MARGINS

The tumor invasion front can be divided in two forms: an expansive pattern and an infiltrative one.

Expansive growth is characterized by linear and well defined margins and in clear continuity with primitive neoplasm. Such growth is associated with a better prognosis.

An infiltrative growth pattern is characterized by tumor cells presence which are single or organized in little and irregular cell cords, with badly defined infiltrative margins. It is associated with a more aggressive decline³⁸.

• PERITUMORAL STROMAL REACTION AND TUMOR ANGIOGENESIS

A higher risk of lymph node metastasis is correlated with a major peritumoral stromal reaction. Peritumoral reactive desmoplasia characterized by extracellular matrix deposition, proliferation and myofibroblastic activation, effectively, it implicates a stimulus of peritumoral neo-lymphangiogenesis, which is the main tumor metastasis viaticum. A thin peritumoral stromal biofilm formation, if it is rich in lymphatic and blood vessels, simplifies tumor spreading access to propagation³⁹.

A neoplasm capacity in inducing, on host side, new vessels formation is a particularly important event in neoplasms spread. Therefore, vascular density in tumor microenvironment is associated with a worse prognosis. This aspect seems to be confirmed in larynx carcinoma, in every stage including the advanced ones and it could determine promising expectations in targeted therapy⁴⁰.



• **Reazione stromale peritumorale e neoangiogenesi tumorale**

Un maggior rischio di metastatizzazione linfonodale e metastatizzazione a distanza è spesso associata ad una maggior reazione stromale peri tumorale. La desmoplasia reattiva peritumorale caratterizzata da deposizione di matrice extracellulare e proliferazione ed attivazione di miofibroblasti, porta infatti con se uno stimolo ed un maggior rischio di neolinfoangiogenesi peri-tumorale, principale viatico della metastatizzazione tumorale. La formazione di un sottile biofilm stromale peritumorale, se ricco in vasi linfatici o sanguigni, facilita l'accesso dello spreading tumorale alle vie di propagazione e metastatizzazione³⁹.

La capacità di una neoplasia di indurre, da parte dell'ospite, la formazione di nuovi vasi è un evento

particolarmente importante nella diffusione delle neoplasie. La densità vascolare nel microambiente tumorale è pertanto associata ad una peggiore prognosi. Questo aspetto sembra essere confermato nel carcinoma della laringe, in tutti gli stadi compresi quelli avanzati e potrebbe determinare spiragli promettenti di target terapia⁴⁰.

Una elevata densità vascolare è inoltre associata a un aumento del rischio di infiltrazione linfonodale e ad una minor risposta alla radioterapia⁴¹.

• **Marker di proliferazione cellulare**

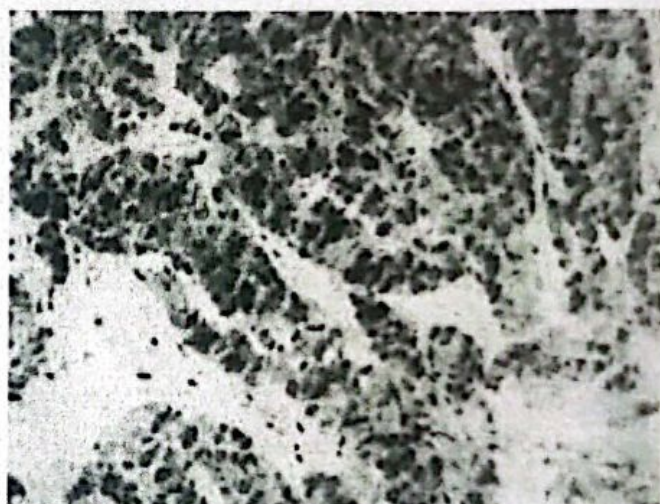
L'attività proliferativa della neoplasia può essere valutata immunoistochimicamente con anticorpi monoclonali volti ad evidenziare l'espressione di Ki-67 (Proteina riscontrabile esclusivamente all'interno del nucleo cellulare, presente durante le fasi G1, S, G2 e mitotica del ciclo cellulare ma assente nella fase G0, rappresentando così un utile marker della frazione di crescita di una data popolazione di cellule) e l'antigene nucleare di proliferazione cellulare o PCNA (È una proteina-cofattore della DNA polimerasi delta, di cui aumenta la processività nella sintesi del filamento guida durante la replicazione del DNA) (Fig.2).

Una elevata positività tissutale per questi marker è strettamente correlata con la perdita

A higher vascular density is, furthermore, associated with a major lymph node metastasis and minor answer to radiotherapy⁴¹.

• **CELLULAR PROLIFERATION MARKER**

Neoplasm proliferation activity can be evaluated by immunohistochemistry with monoclonal antibodies intending to highlight Ki-67 expression (protein only found into cellular nucleus in G1, S, G2 phases and during the mitotic phase of cell cycle, but it is missing in G0 phase, representing such a useful growth fraction marker of a certain cell population) and nuclear antigen of cellular proliferation or PCNA (it is a DNA polymerase delta cofactor-protein, whose processivity increases in fiber guide synthesis during DNA replication) (Fig.2).



*Fig.2. Positività per Ki67
Fig.2. Ki 67 positivity in Larynx carcinoma.*

A higher tissue positivity for such markers is strictly related to cellular differentiation loss and lymphnode metastasis presence^{42, 43}.

• **MOLECULAR MARKERS**

Contrary to the expectations, prognostic value of altered P53 has proved to be inconclusive in different studies about larynx carcinoma. Tumor protein P53, well-known for its antineoplastic role and described as "genome guardian" (it is able to activate damaged DNA replication, block cell cycle, promote apoptosis) didn't demonstrate such an alteration to determine a prevalent role in predicting neoplastic progression of the larynx^{44, 45, 46, 47}.

The CCND1 amplification has shown to be



di differenziazione cellulare e la presenza di metastasi linfonodali^{42, 43}.

• Marker molecolari

Differentemente dalle attese il valore prognostico di p53 alterato si è dimostrato inconcludente nel carcinoma laringeo in diversi studi. La proteina tumorale 53, celebre per il suo ruolo antineoplastico, descritta come "il guardiano del genoma" in quanto in grado di: attivare la riparazione del DNA danneggiato, bloccare il ciclo cellulare, promuovere l'apoptosi, non si è dimostrata alterazione tale da determinare un ruolo preponderante nella predittività della progressione neoplastica laringea^{44, 45, 46, 47}.

L'amplificazione di CCND1 si è dimostrata correlata ad una prognosi infausta ed una maggior aggressività della neoplasia indipendentemente dallo stadio. Il gene CCND1, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 11, codifica per la proteina CiclinaD1, di 295aa, necessaria per la progressione dalla fase G1 del ciclo cellulare e quindi per la proliferazione tumorale^{48, 49}.

La prognosi infausta potrebbe essere ulteriormente suffragata dalla simultanea over-espressione dei prodotti di CCND1 e CDK4. La proteina CDK4, espressione del gene CDK4 è un membro della famiglia delle Ser/Thr protein kinasi. È un enzima avente una subunità catalitica importantissima per il superamento del "punto di restrizione", il primo punto di controllo del ciclo cellulare, collocato alla fine della fase G1. Superandolo, la cellula inizia a duplicare il proprio DNA entrando nella fase S⁵⁰.

Anche la mutazione di CDKN2A ha un rilevante significato prognostico infausto. CDKN2A è un gene localizzato sul cromosoma 9 tradotto in due proteine: p16 o p16INK4a e p14arf. Entrambe svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione del ciclo cellulare e nella immunosoppressione tumorale: p16 è in grado di inibire l'attività proliferativa delle CD4 e CD6 e di bloccare trasversalmente la progressione da G1 a S del ciclo cellulare mentre p14arf è in grado di attivare la p53⁵¹.

• Marker immunoistochimici di superficie

Ad oggi la necessità di integrare la classificazione TNM con nuovi e diversificati fattori

correlated with a unfavourable prognosis and a higher neoplasm aggressiveness independently from stages. The CCND1 gene, located on the long arm of chromosome 11, encodes the cyclin D1 protein, of 295aa, necessary for cell cycle G1 phase progression and then for tumor proliferation^{48, 49}.

The unfavourable prognosis could be further supported by simultaneous overexpression of CCND1 and CDK4 products. The CDK4 protein, encoded by CDK4 gene is a member of the Ser/Thr protein kinase family. It is an enzyme with a catalytic subunit that is very important for overcoming "restriction point" located at the end of G1 phase. By overcoming it, the cell starts replicating its DNA and enters S phase⁵⁰.

Even CDKN2A mutation has an unfavourable prognostic role. CDKN2A is a gene located on chromosome 9 translated into two proteins: p16 or p16INK4a and p14arf. Both play a leading role by regulating the cell cycle and in tumor immunosuppression: p16 is able to inhibit the proliferation activity of CD4 and CD6 and to block the cell cycle progression from G1 to S while p14arf is able to activate p53⁵¹.

• IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS

To date the need to complete the TNM classification with new and diversified prognostic patterns is very common in the scientific community. Over the last 20 years, the histopathology role wasn't reduced to tissue diagnosis, but it completed its discipline with prognostic predictions of remarkable impact in patient's management. Different histomolecular patterns study and their use as tumor characterization markers has and will have a more and more important role both in preventing and in treating patients affected by neoplasm. For each tumor, different panels of immunohistochemical markers of surface could be outlined, which are able to characterize neoplastic cell clones behavior and aggressiveness. Besides this concept and as example of methodic evaluation, following a precise literature review, potential markers characterizing squamous cell carcinoma of the larynx can be:

- **CD44:** *it is a multifunctional cell-surface protein found in every cell of our body and involved in cell-cell and extracellular matrix interactions, in cell traffic and in lymphocyte homing. The hyaluronic acid,*



prognostici è ampiamente diffusa nella comunità scientifica. Nel corso degli ultimi 20 anni il ruolo della istopatologia non si è più limitato alla diagnosi tissutale ma ha integrato la sua disciplina con previsioni prognostiche di notevole impatto sul management del paziente.

Lo studio dei diversi pattern istomolecolari ed il loro utilizzo come marker di caratterizzazione tumorale, ha ed avrà un ruolo sempre più importante sia nella prevenzione che nel trattamento dei pazienti con neoplasia.

Si potrebbero delineare, per ciascun tumore, diversi panel di marker immunoistochimici di superficie in grado di caratterizzare il comportamento e l'aggressività dei cloni cellulari neoplastici.

A corollario di questo concetto e come esempio di metodica di valutazione, dopo attenta revisione della letteratura, potenziali marker caratterizzanti il carcinoma squamocellulare della laringe possono essere:

➤ **CD44:** È una multifunzionale molecola di adesione superficiale riscontrata in maniera ubiquitaria sulle cellule del nostro corpo e coinvolta nelle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice, nel traffico cellulare, nell'homing linfocitario. L'Acido Ialuronico, un importante componente della matrice extracellulare è il principale, ma non unico, ligando di CD44. Altri ligandi sono: fibronectina, laminina, chondroitinsolfato, addressina, serglycina, osteopontina. È stato dimostrato in alcuni modelli animali come l'iniezione di reagenti che interferiscono con la sede di legame di CD44 (ad esempio CD44s o CD44v- anticorpo specifico) inibiscono la locale crescita tumorale e lo spread linfonodale. Si spera quindi che l'identificazione sempre più sensibile di varianti di CD44 espresse dalla neoplasia ma non dalle cellule normali possa in futuro svolgere un ruolo target nella terapia, limitandone la crescita³².

➤ **E-cadherina:** La transazione epitelio mesenchimale (EMT) è un processo biologico che consente lo sviluppo embrionale, il rimodellamento tissutale e

an important element of the extracellular matrix, is the main, but not the only, CD44 ligand. The other ligands are: fibronectin, laminin, chondroitin sulfate, addressin, serglycin and osteopontin. It has been proved in some animal models that the injection of reagents that interferes with CD44 site (as CD44s or CD44v-specific antibody) inhibits local tumor growth and lymphnode spread. So, we hope that a more and more sensitive identification of CD44 variants expressed by neoplasm, but not expressed by normal cells, could play a target role in therapy in the future, by reducing its growth³².

➤ **E-cadherin:** *mesenchymal-epithelial transition (MET) is a biological process that allows embryonic development, tissue remodeling and wound repair. Such mechanism allows an epithelial cell to start biochemical changes which lead it to acquire a mesenchymal phenotype that includes: an increase of migration capacity, invasivity and a high resistance to apoptosis. Therefore, as epithelial cells keep cell-cell junctions tight and keep a certain polarity, mesenchymal cells are much more moving and they come into contact with extracellular matrix more rarely. Invasion, progression and neoplastic metastasis are strongly related to a such transformation (Fig. 3). Among the major and the most common events characterizing MET, there is the loss or the reduction of E-cadherin expression, statistically associated with minor values of long-term survival; it could be used as recognition marker and as tumor phenotype prognosis with a higher risk of infiltration and metastasis. Recent studies have shown how low values of E-cadherin expression are typical of neoplastic low differentiated^{33, 34}.*

➤ **CD117:** *transmembrane protein encoded by proto-oncogene c-kit. With its own ligand, SCF or Stem cell factor, this molecule plays a leading role in regulating different cell activities as apoptosis, cell differentiation, proliferation and cell bond³⁵.*



la riparazione delle ferite. Tale meccanismo consente ad una cellula epiteliale di iniziare cambiamenti biochimici che la portano ad assumere un fenotipo mesenchimale che include: aumento delle capacità migratorie, invasività, elevata resistenza all'apoptosi. Così, mentre le cellule epiteliali mantengono più strette giunzioni cellula-cellula e mantengono una certa polarità, le cellule mesenchimali sono molto più mobili e più raramente entrano in contatto con la matrice extracellulare. L'invasione, la progressione e la metastatizzazione neoplastica sono fortemente correlate a tale trasformazione (Fig.3). Tra i maggiori e più comuni eventi che caratterizzano la EMT vi è la perdita o riduzione dell'espressione di E-cadherina, statisticamente associata a valori minori di sopravvivenza a lungo termine; potrebbe essere utilizzata come marker per riconoscimento e prognosi di fenotipi tumorali con più alto rischio di infiltrazione e metastatizzazione. Recenti studi hanno dimostrato come bassi valori dell'espressione di E-cadherina sono caratteristici di istotipi neoplastici scarsamente differenziati^{53,54}.

- **CD117:** Proteina transmembrana codificata dal proto-oncogene c-kit. A seguito del legame col proprio ligando, SCF o Stem cell factor, questa molecola svolge un importante ruolo nella regolazione di diverse attività cellulari come apoptosi, differenziazione cellulare, proliferazione e adesione cellulare⁵⁵. L'espressione di CD117 è di norma frequente in un gran numero di cellule sane del nostro organismo, ma l'overespressione potrebbe essere fortemente associata ad una più bassa sopravvivenza dovuta alla facilità di metastasi linfonodale⁵⁶.
- **CD3:** E' oggi ampiamente riconosciuto quanto la risposta immunitaria dell'ospite svolga un importante ruolo di prevenzione nella progressione tumorale. Diversi studi hanno dimo-



Fig.3. Espressione di E-cadherina in un carcinoma Squamocellulare della Laringe (International Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery, 2014)

Fig.3. E-cadherina expression in squamous cell carcinoma of Larynx (International Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery, 2014)

The CD117 expression is normally frequent in numerous healthy cells in our organism, but the overexpression could be strongly associated with a lower survival due to the facility of lymphnode metastasis⁵⁶.

- **CD3:** Today, it is well known that the immune response plays an important role in preventing tumor progression. Different studies have shown that the inflammatory cell infiltration in tumors is associated with a higher survival, independently from the pathologic stage. If the quantity of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) is higher, the prognosis seems to be a better one⁵⁷. By studying different cell subtypes, T CD3+ seem to be the best marker to predict the patient's immune response to neoplasm and, even if they haven't been introduced in clinical practice yet, to represent a prognostic parameter useful for patients' risk stratification⁵⁸.
- **CD 34:** We define angiogenesis the development of new vascular vessels from pre-existing vessels. This development is fundamental in growth, progression and in



strato come l'infiltrazione di cellule infiammatorie nei tumori è associata ad una maggiore sopravvivenza, indipendentemente dallo stadio della patologia. Maggiore è la quantità di Linfociti Infiltranti il Tumore, TIL, migliore sembra essere la prognosi⁵⁷. Studiando i diversi sottotipi cellulari, i linfociti T CD3+ sembrano essere il miglior marker di previsione della risposta immunitaria del paziente alla neoplasia e, anche se non ancora introdotti nella pratica clinica, rappresentare un parametro prognostico utile nella stratificazione del rischio dei pazienti⁵⁸.

- **CD34:** Si definisce Angiogenesi lo sviluppo di nuovi capillari vascolari da preesistenti vasi. Questo sviluppo è essenziale per la crescita, la progressione e la successiva metastatizzazione di ogni neoplasia. Uno dei metodi utilizzati per valutare lo sviluppo angiogenetico di una neoplasia è l'applicazione di tecniche immunoistochimiche con l'utilizzo di anticorpi diretti verso CD34, un antigene composto di glicoproteine, presente in particolar modo sulle cellule progenitrici ematopoietiche ma anche sulle cellule endoteliali. L'anticorpo monoclonale anti-CD34 può pertanto essere utilizzato per lo studio di tumori ematopoietici ma anche per tumori vascolari, per distinguere endoteli normali da varianti neoplastiche o per valutare il livello di neovascolarizzazione della neoplasia, andando a definire la densità microvascolare, MVD⁵⁹.

- **Invasione perivascolare e perineurale**

La presenza e la penetrazione di cellule tumorali nei vasi linfatici e sanguigni o l'invasione perineurale sono correlati con un aumentato rischio di metastasi linfonodali o a distanza, recidiva di malattia, bassa sopravvivenza, denotando una maggior aggressività del Carcinoma squamocellulare^{60, 61}.

- **Ploidia del DNA e responsività alla radioterapia**

La ploidia corrisponde alla quantità di DNA

the following metastasis of every neoplasm. One of the methods used for evaluating the angiogenesis development of a neoplasm is the application of immunohistochemical techniques by using antibodies V's CD34, an antigen composed of glycoproteins, particularly located in hematopoietic progenitor cells, but in endothelial cells too. Therefore, monoclonal anti-CD34 antibody can be used in order to study hematopoietical tumors, but also vascular tumors, to distinguish normal endothelium from neoplastic variants or to evaluate the level of neoplasm neovascolarization, which defines the micro vascular density, (MVD)⁵⁹.

- **PERINEURAL AND PERIVASCULAR INVASION**

The presence and the penetration of tumor cells in lymphatic and blood vessels or the perineural invasion are related to an increased risk for lymph-node metastasis, tumour recidive, low survival, which indicates a higher aggressiveness of squamous cell carcinoma^{60, 61}.

- **DNA PLOIDY AND RESPONSIVITY TO RADIOTHERAPY**

Ploidy is the quantity of DNA into cell chromosomes and it can be evaluated by flow cytometry and static image analysis. The prognostic meaning of the alteration of the number of chromosomes in neoplastic cell, even though it has been studied largely, remains controversial. The most common chromosomal alterations observed in squamous cell carcinoma are: +3q, +5p, +8q, +11q13, +17q and -3p. Initial promoter and trigger factor of neoplastic process is +3q21-29, followed, in order of importance and timing, by -3p deletion. Moreover, there are some important points of genetic amplification that concern locus containing oncogenes as CCND1 situated on 11q13^{60, 61, 67}.

If most of the studies have shown that metastatizing tumors present a high number DNA copies altered compared to not-metastatizing tumors, others studies, indeed, have shown that life expectation in advanced tumors is better in tumors presenting major chromosomal alterations. This conflict may depend on the tight connection between chromosomal alteration and response to radiotherapy treatment: tumors with major chro-



contenuta nei cromosomi delle cellule e può essere valutata con la citometria a flusso e l'analisi di immagine statica.

Il significato prognostico dell'alterazione del numero di cromosomi nella cellula neoplastica, sebbene largamente studiato, resta controverso.

Le più frequenti alterazioni cromosomiche riscontrate nel carcinoma squamocellulare sono: +3q, +5p, +8q, +11q13, +17q, e -3p.

Promoter iniziale e fattore di innesco del processo neoplastico è +3q21-29, seguito in ordine di importanza e tempistica dalla delezione -3p. Importanti sono inoltre alcuni punti di amplificazione genetica che interessano loci contenenti oncogeni come CCND1 localizzato su 11q13^{62, 64, 67}.

Se la maggior parte degli studi hanno dimostrato come i tumori metastatizzanti presentano un elevato numero di copie del DNA alterate rispetto a tumori non metastatizzanti, altri studi hanno però dimostrato come l'aspettativa di vita in tumori in stadio avanzato sia migliore per tumori con maggiori alterazioni cromosomiche.

Tale conflitto risulta probabilmente dipendere dalla stretta correlazione tra alterazioni cromosomiche e risposta al trattamento radioterapico: i tumori con maggiori alterazioni cromosomiche sono in effetti i più aggressivi e presentano una maggior facilità nella metastatizzazione linfonodale, ma sono anche instabili e maggiormente responsivi alla radioterapia^{63, 65, 66}.

• Micro RNA

Negli ultimi anni, la lista delle classi di geni classicamente considerati come oncosoppressori o oncogeni è stata rivisitata, essendosi resa necessaria l'espansione di quest'ultima per includere anche la famiglia dei miRNA; queste molecole di RNA sono in grado di regolare negativamente la stabilità e il processo di traduzione degli mRNA e risultano implicate in diversi processi cellulari quali controllo del ciclo cellulare, differenziamento ed apoptosi^{68, 69}.

Un significativo numero di geni dei miRNA sono localizzati in regioni genomiche frequentemente riarrangiate nei tumori, come siti fragili, regioni delete (minimal region of loss of

mosomal alterations are, effectively, the most aggressive ones and they present a major facility in lymphnode metastasis, but also they are variable and more responsive to radiotherapy^{67, 68, 69}.

• MICRORNA

In recent years, the list of gene classically considered as oncosuppressors or oncogenes has been reexamined, whose expansion has become necessary in order to include the miRNA family too; these RNA molecules are able to negatively regulate the stability and the process of miRNA translation and they are known to be implied in different cell processes as cell cycle control, differentiation and apoptosis^{68, 69}.

An important number of miRNA genes is located in genomic regions, often rearranged in tumors, delete regions (minimal region of loss of heterozigosity, LOH) or amplified (minimal amplicons) and common regions of break-point, which provide a further evidence of their role in cancer pathogenesis.

miRNA are a family composed of little endogenous RNA with single filament (ss), between 21 and 25 nucleotides long. Particularly, miRNA act through the identification of specific miRNA targets in order to determine their degradation or repression of translation. From a functional point of view, it has been demonstrated that there are numerous miRNA capable of identifying more targets and that most of them can be regulated by different miRNA. These statements, therefore, allow to consider single miRNA as little elements of control of more complex regulator pathways at the base of numerous and fundamental functions including cycle cell regulation, cell proliferation, differentiation and apoptosis, and then they include some process concerning the whole organism, including embryonic development and immune response, and tumors^{67, 71}.

To date, about a hundred human miRNA have been identified, 940 according to the most recent version of miRBase, both via a sperimental approach and via computational analysis. Recently, the presence of miRNA in serum and human plasma has been observed in different tumor types as colon, prostate, breast, lung, ovary and other ones. These miRNA can be used as discriminant markers which are not invasive for tumor phenotype



heterozigosity, LOH) o amplificate (minimal amplicons) e regioni comuni di break-point, fornendo un'ulteriore evidenza del loro ruolo nella patogenesi del cancro. I miRNA costituiscono una famiglia di piccoli RNA endogeni, non codificanti, a singolo filamento (ss), di una lunghezza compresa tra i 21 e i 25 nucleotidi. In particolare, i miRNA agiscono mediante il riconoscimento di specifici mRNA targets al fine di determinarne la degradazione o la repressione della traduzione. Da un punto di vista funzionale è stato dimostrato che esistono numerosi miRNA capaci di riconoscere più targets e che molti di questi possono essere regolati da diversi miRNA. Tali affermazioni consentono pertanto di considerare i singoli miRNA come piccoli elementi di controllo di più complesse pathways regolatrici, che nei fatti stanno alla base di numerose e fondamentali funzioni, che spaziano da quelle prettamente cellulari, tra cui la regolazione del ciclo cellulare, la proliferazione cellulare, il differenziamento e l'apoptosi, per poi coinvolgere alcuni processi che riguardano l'intero organismo, comprendenti lo sviluppo embrionale e la risposta immunitaria, e i tumori^{70, 71}.

Ad oggi sono stati identificati centinaia di miRNA umani, 940 secondo la più recente versione di miRBase, sia mediante un approccio sperimentale sia mediante analisi computazionale. Recentemente è stata osservata la presenza dei miRNA nel siero e nel plasma umano in diversi tipi tumorali quali colon, prostata, seno, polmone, ovaio e altri tipi. Questi miRNA possono essere utilizzati come marcatori discriminanti non invasivi per la diagnosi del fenotipo tumorale. I livelli dei miRNA nel siero sono molto stabili e possono essere individuati mediante semplici prelievi di sangue. Infatti, i miRNA, che di per sé sono molecole in grado di resistere a cambiamenti di temperatura, quali quelli determinati da bollitura o congelamento, e a cambiamenti di pH, nel siero risultano essere anche protetti dall'attività delle RNAsi. È stato dimostrato per alcuni tumori che i miRNA circolanti nel siero hanno origine tumor-specifica e ciò ha suggerito la possibilità di utilizzarli come nuovi biomarcatori molecolari

diagnosis. miRNA levels in serum are very stable and they can be identified through simple blood samples. Effectively, miRNA, which are basically molecules able to resist to temperature changes, as those depending on boiling or freezing, and to pH changes, prove to be also protected in serum by RNase activity. It has been demonstrated that for some tumors, miRNA circulating in serum have a specific tumor origin and this has suggested the possibility to use them as new molecular biomarkers not invasive in early diagnosis of cancer.

It must be highlighted the fact that these microRNA can be prognostic both if they are considered individually and as groups. MicroRNA analysis can allow to identify the most aggressive tumors and there are excellent possibilities that these molecules may be used in the future as targets in order to develop new therapeutic strategies.

Moreover, microRNA have been suggested as excellent biomarkers salivary for their facility of isolation and identification by a quantitative PCR, so they can be used as diagnostic element, as prognostic biomarkers and dynamical markers to response to therapy since they could be easily obtained, by a non-invasive way and dosed. Saliva is an easily accessible mean where it has been demonstrated the presence of micro vesicles (exosomes) containing microRNA. Identifying and characterizing miRNA in individuals affected with laryngeal carcinoma could be useful to obtain important diagnostic and prognostic elements (Fig. 1)^{72, 73}.



Fig. 1. Studi sui precipitati di Orosfere per effettuare miRNA array. Fonte: Oncotarget, Advance Publication 2014

Fig. 1. Orospheres evaluation for MicroRNA characterization. Data: Oncotarget, Advance publication 2014



non invasivi nella diagnosi precoce del cancro.

Da sottolineare è il fatto che questi mi-
croRNA possono essere prognostici sia se
considerati individualmente che come gruppi.
L'analisi dei microRNA ci può permettere di
identificare i tumori più aggressivi e ci sono
ottime possibilità che queste molecole possano
in futuro essere utilizzate come bersagli per
lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.
Inoltre, i microRNA sono stati proposti come
eccellente biomarkers salivari per la loro facilità
di isolamento e di identificazione attraverso
una PCR quantitativa, potendo quindi servire
come elemento diagnostico, come biomarcatori
prognostici e marcatori dinamici di risposta
alla terapia in quanto possono essere ottenuti
facilmente, in modo non invasivo e dosati. La
saliva è un mezzo facilmente accessibile in cui è
stata dimostrata la presenza di micro vescicole
(exosomi) che racchiudono microRNA. Iden-
tificare e caratterizzare i miRNA in soggetti
affetti da carcinoma laringeo potrebbe essere
utile nel ricavare importanti elementi diagno-
stici e prognostici (Fig.4)^{72, 75}.

Conclusioni

La sopravvivenza specifica per malattia del
cancro della laringe è condizionata da mol-
plici fattori prognostici ma si è concordi nel
definire la presenza di metastasi linfonodali
laterocervicali come il fattore prognostico più
importante. Tumori laringei identici per sede,
sottosede e stadio clinico, sottoposti al medesi-
mo trattamento, possono presentare un'evolu-
zione clinica e prognosi differente, soprattutto
per quanto riguarda la diffusione linfonodale.
In base a tale premessa, appare chiaro che il
presupposto per una visione moderna della
oncologia è la ricerca di fattori prognostici
predittivi della evoluzione biologica e clinica
del tumore al fine di modularne il trattamento.

Ad oggi valide informazioni si possono, già,
ottenere da una attenta valutazione di un panel
di fattori prognostici clinici, istopatologici ed
immunostochimici che abbiamo ampiamente
discusso nel nostro studio. Il limite che accu-
muna la gran parte di questi fattori prognostici
è che la loro più piena espressione si basa sul-

Conclusions

*The specific survival for laryngeal cancer disease
is influenced by various prognostic factors, but
authors agrees to define laterocervical lymphnode
metastasis the most important prognostic factor.
Laryngeal tumors equal in site, subregion and
clinical stage, exposed to the same treatment,
can present a clinical evolution and a different
prognosis, especially with regard to lymphnode
spread. According to this foreword, it is clear that
the supposition for a modern vision of oncology
is the research of predictive prognostic factors in
biological an clinical evolution of tumor in order
to modulate its treatment.*

*To date, efficient information can be already
obtained from an accurate evaluation of a panel of
prognostic, clinical, hisopathological and immuno-
histochemical factors, which have been extensively
documented in our study. The limit that combines
most of these prognostic factors is the fact that
their fullest expression is based on the analysis
of surgical evidence, so in a formerly advanced
phase of treatment. Therefore, by providing few
information in the initial phase of diagnostic and
therapeutic iter.*

*It is common opinion in literature that biomo-
lecular markers could fill such lack, especially if
the great potentialities of studies on microRNA
are considered.*

*Certainly, molecular biology technologies are
still not available in all centers, so, today it is
difficult miRNA application on a large scale in
laryngeal carcinoma treatment. Yet, the real time
PCR methods are, actually, little expensive and
easily feasible.*

*The bottleneck of this kind of study is, effectively,
represented by researching miRNA expressed in a
different way through the use of low density arrays
and the following validation on a wide number of
patients. Once they have been validated, miRNA
represent biomarkers easy to determine patients'
tissue affected with cancer and other neoplasms.
Another advantage connected to miRNA is repre-
sented by their presence in body fluids and partic-
ularly in patients' plasma, serum and saliva from
which they are easy to determine and to dose by
really reasonable costs. Since 2014, Authors have
started a study on miRNA, by searching them in*



la analisi del "reperto operatorio", fornendo quindi, poche informazioni nella fase iniziale dell'iter diagnostico-terapeutico.

È opinione concorde in letteratura che i marker biomolecolari possano colmare tale carenza, soprattutto se si considerano le grosse potenzialità degli studi sui microRNA.

Sicuramente le tecnologie di biologia molecolare non sono ancora a disposizione in tutti i centri per cui non è facilmente auspicabile un utilizzo dei miRNA su vasta scala nel trattamento del carcinoma della laringe. Tuttavia le metodiche di real time PCR sono effettivamente poco costose e facilmente realizzabili. Il collo di bottiglia di questo tipo di studio è infatti rappresentato dalla ricerca di miRNA differenzialmente espressi attraverso l'impiego di low density arrays e la sua successiva validazione su una ampia popolazione di pazienti. Una volta validati, i miRNA rappresentano biomarcatori facili da determinare nel tessuto dei pazienti affetti da cancro ed altre neoplasie.

patients' healthy and sick tissues, serum and saliva with laryngeal cancer; the brilliant outcomes obtained until now presume a revolutionary innovation: from next year we will have a routine pre and post-surgical application of miRNA in the clinical evaluation of the patient affected with laryngeal carcinoma.

Un altro vantaggio legato ai miRNA è la loro presenza nei fluidi corporei ed in particolare nel plasma, siero e saliva dei pazienti da cui sono facilmente determinabili e dosabili con costi veramente esigui. Dal 2014 gli Autori hanno intrapreso uno studio sui miRNA, ricercandoli nei tessuti sani e malati, nel siero e nella saliva dei pazienti con cancro della laringe; i brillanti risultati ottenuti finora sono il presupposto per una rivoluzionaria innovazione: dal prossimo anno avremo un impiego routinario pre e post-operatorio dei miRNA nella valutazione clinica del paziente con carcinoma della laringe.

Bibliografia - References

1. Succo G, Crossetti E, Bertolin A, Lucioni M, Caracciolo A, Panetta V, Sprio AE, Berta GN, Rizzotto G. Benefits and drawbacks of open partial horizontal laryngectomies, Part A: Early-intermediate stage glottic carcinoma. *Head Neck*. 2015 Jan 10. doi: 10.1002/hed.23997. [Epub ahead of print]
2. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer* (2013) 49, 1374-1403.
3. Spriano G, Manciocco V, Marchesi P, Pichi B, Cristalli C, Pellini R, Ruscito P. Il trattamento dell'N nel carcinoma della laringe. *Attualità in oncologia laringea* 2010; 553-574.
4. Ricardo Barroso Ribeiro, Eduardo Ribeiro Breda, Eurico Fernandes Monteiro. Prognostic Significance of Nodal Metastasis in Advanced Tumours of the Larynx and Hypopharynx. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2012;63(4):292-298.
5. Chiesa F, Squadrelli Saraceno M, Fattori prognostici in oncologia cervico-facciale: linee guida per l'uso nella pratica clinica. AOOI, 1999.
6. Leon Barnes, John W. Eveson, Peter Reichart, David Sidransky, *Pathology & Genetics Head and Neck Tumours*, WHO/IARC, Lyon 2005.
7. Dreyfuss AI, Clark JR. Analysis of prognostic factors in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Hematol Clin North Am* 1991;5:701-12.
8. Boffetta P, Merletti F, Magnani C, et al., Prognostic factors and survival of laryngeal cancer patients from Turin, Italy, A population-based study. *Am J Epidemiol* 1997; 145:1100-5.
9. Cortesina G, *Oncogeni e carcinogenesi dei carcinoma cervico-cefalici*. Torino: Edizione Minerva Medica, 2002.
10. Chen AY, Matson LK, Roberts D, et al., The significance of comorbidity in advanced laryngeal cancer. *Head Neck* 2001;23:566-72.
11. Hall SF, Groome PA, Rothwell D, The impact of comorbidity on the survival of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 2000;22:297-302.
12. Magnano M, Bussi M, De Stefani A, et al. Prognostic factors for head and neck tumor recurrence. *Acta otolaryngol* 1995;115:833-8.
13. Ferrero V, Palonta F, Preti G, et al., Il ritardo diagnostico del carcinoma laringeo. Ed. Omega 2002:5-26.
14. Piquet JJ, Chevalier D, *Adenopathies cervicales*. *Encycl Med Chir (Paris, France), Oto-Rhino-Laryngologie* 20870 A10,6-1990.
15. Ferlito A, Recher G (1980). Ackerman's tumor (verrucous carcinoma) of the larynx: a clinicopathologic study of 77 cases. *Cancer* 46: 1617-1630.
16. Koch BB, Trask DK, Hoffman HT, Karnell LH, Robinson RA, Zhen W, Menck HIR (2001). National survey of head and neck verrucous carci-



- nomia: patterns of presentation, care, and outcome. *Cancer* 92: 110-120.
17. Orvidas LJ, Olsen KD, Lewis JE, Suman VJ (1998). Verrucous carcinoma of the larynx: a review of 53 patients. *Head Neck* 20: 197-203.
 18. Klijanienko J, el Naggar A, Ponzio-Prion A, Marandas P, Micheau C, Caillaud JM (1993). Basaloid squamous carcinoma of the head and neck. Immunohistochemical comparison with adenoid cystic carcinoma and squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 119: 887-890.
 19. Paulino AF, Singh B, Shah JP, Huvos AG (2000). Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 110: 1479-1482.
 20. Crissman JD, Kessiss T, Shah KV, Fu YS, Stoler MH, Zarbo RJ, Weiss MA (1988). Squamous papillary neoplasia of the adult upper aerodigestive tract. *Hum Pathol* 19: 1387-1396.
 21. Ereno C, Lopez JI, Sanchez JM, Bilbao FJ (2001). Papillary squamous cell carcinoma of the larynx. *J Laryngol Otol* 115: 164-166.
 22. Ferlito A, Devaney KO, Rinaldo A, Putzi MJ (1999). Papillary squamous cell carcinoma versus verrucous squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 108: 318-322.
 23. Suarez PA, Adler-Storthz K, Luna MA, El Naggar AK, Abdul-Karim FW, Batsakis JG (2000). Papillary squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract: a clinicopathologic and molecular study. *Head Neck* 22: 360-368.
 24. Thompson LD, Wenig BM, Heffner DK, Gnepp DR (1999). Exophytic and papillary squamous cell carcinomas of the larynx: A clinicopathologic series of 104 cases. *Otolaryngol Head Neck Surg* 120: 718-724.
 25. Berthelet E, Shenouda G, Black MJ, Picariello M, Rochon I. (1994). Sarcomatoid carcinoma of the head and neck. *Am J Surg* 168: 455-458.
 26. Batsakis JG, Suarez P (2000). Sarcomatoid carcinomas of the upper aerodigestive tracts. *Adv Anat Pathol* 7: 282-293.
 27. Lewis JE, Olsen KD, Sebo TJ (1997). Spindle cell carcinoma of the larynx: review of 26 cases including DNA content and immunohistochemistry. *Hum Pathol* 28: 664-673.
 28. Thompson LD, Wieneke JA, Miettinen M, Heffner DK (2002). Spindle cell (sarcomatoid) carcinomas of the larynx: a clinicopathologic study of 187 cases. *Am J Surg Pathol* 26: 153-170.
 29. Batsakis JG, Huser J (1990). Squamous carcinomas with glandlike (adenoid) features. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 99: 87-88.
 30. Hertenstein JC (1986). Pathologic quiz case 1. Acantholytic squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 112: 780-782.
 31. Alos L, Castillo M, Nadal A, Caballero M, Mallofre C, Palacin A, Cardesa A (2004). Adenosquamous carcinoma of the head and neck: criteria for diagnosis in a study of 12 cases. *Histopathology* 44: 570-579.
 32. Fujino K, Ito J, Kanaji M, Shiomi Y, Saiga T (1995). Adenosquamous carcinoma of the larynx. *Am J Otolaryngol* 16: 115-118.
 33. Keelawat S, Liu CZ, Roehm PC, Barnes L (2002). Adenosquamous carcinoma of the upper aerodigestive tract: a clinicopathologic study of 12 cases and review of the literature. *Am J Otolaryngol* 23: 160-168.
 34. Blackwell KE, Fu YS, Calcaterra TC. Laryngeal dysplasia. *Cancer* 1995; 75: 457-63.
 35. Edge SB, et al. *AJCC cancer staging manual*, 7th ed. New York, Springer, 2010.
 36. Magnano M, Bussi M, De Stefani A et al. Prognostic factors for head and neck tumor recurrence. *Acta Otolaryngol. (Stockh)* 1995; 115: 833-8.
 37. Resnick MJM, Uhlman D, Niehans GA et al. Cervical lymph node and survival in laryngeal carcinoma: prognostic factors. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104: 685-94.
 38. Bryne M, Jenssen N, Boysen M (1995). Histological grading in the deep invasive front of T1 and T2 glottic squamous cell carcinomas has high prognostic value. *Virchows Arch* 427: 277-281.
 39. Zidar N, Gale N, Kambic V, Fischinger J (2001). Expression of tenascin and fibronectin in benign epithelial hyperplastic lesions and squamous carcinoma of the larynx. *Anticancer Res* 21: 451-454.
 40. Murray JD, Carlson GW, McLaughlin K et al. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in laryngeal cancer. *Am J Surg* 1997; 174: 523-6.
 41. Jenssen N, Boysen M, Kjaerheim A, Bryne M. Low vascular density indicates poor response to radiotherapy in small glottis carcinomas. *Pathol Res Pract* 1996; 192: 1090-4.
 42. Zidar N, Gale N, Cor A, Kambic V (1996). Expression of Ki-67 antigen and proliferative cell nuclear antigen in benign and malignant epithelial lesions of the larynx. *J Laryngol Otol* 110: 440-445.
 43. Franchi A, Gallo O, Boddi V, Santucci M (1996). Prediction of occult neck metastases in laryngeal carcinoma: role of proliferating cell nuclear antigen, MIB-1, and E-cadherin immunohistochemical determination. *Clin Cancer Res* 2: 1801-1808.
 44. Strachan T, Read AP. (2004). *Human Molecular Genetics* 3. Ch. 17, Cancer Genetics
 45. Assimakopoulos D, Kolettas E, Zagorianakou N, Evangelou A, Skevas A, Agnantis NJ (2000). Prognostic significance of p53 in the cancer of the larynx. *Anticancer Res* 20: 3355-3364.
 46. Nadal A, Campo E, Pinto J, Mallofre C, Palacin A, Arias C, Traserra J, Cardesa A (1995). p53 expression in normal, dysplastic, and neoplastic laryngeal epithelium. Absence of a correlation with prognostic factors. *J Pathol* 175: 181-188.
 47. Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA (2000). The



- p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med* 29: 413-425.
48. Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL (Aug 2011). Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nature Reviews. Cancer* 11 (8): 558-72.
 49. A, Almadori G, Cavallo S, Cadoni G, Galli J, Ferrandina G, Scambia G, Neri G. (1996). Cyclin D1 gene amplification in human laryngeal squamous cell carcinomas: prognostic significance and clinical implications. *Clin Cancer Res* 2: 175-180.
 50. Dong Y, Sui L, Sugimoto K, Tai Y, Tokuda M (2001). Cyclin D1-CDK4 complex, a possible critical factor for cell proliferation and prognosis in laryngeal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 95: 209-215.
 51. Bazan V, Zanna I, Migliavacca M, Sanz-Casla MT, Maestro ML, Corsale S, Macaluso M, Dardanoni G, Restivo S, Quintela PL, Bernaldez R, Salerno S, Morello V, Tomasino RM, Gebbia N, Russo A (2002). Prognostic significance of p16INK4a alterations and 9p21 loss of heterozygosity in locally advanced laryngeal squamous cell carcinoma. *J Cell Physiol* 192: 286-293.
 52. Naor D, et al. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res.* 1997;71:241-319.
 53. Vasca, E.M., et al. (2014) Immunohistochemical Examination of E-Cadherin in the Head and Neck Squamocellular Carcinomas. *International Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery*, 3, 330-336.
 54. Schipper, H., Frixen, U.H., Behrens, J., Unger, A., Jahnke, K. and Birchmeier, W. (1991) E-Cadherin Expression in Squamous Cell Carcinomas of Head and Neck: Inverse Correlation with Tumor Dedifferentiation and Lymph Node Metastasis. *Cancer Research*, 51, 6328-6337.
 55. Miettinen M, et al. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2005; 13:205-220.
 56. Heinrich MC, et al. Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol.* 2002; 20:1692-1703.
 57. Hanahan D, et al. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144(5):646-674.
 58. Roxburgh CS, et al. The role of the in situ local inflammatory response in predicting recurrence and survival in patients with primary operable colorectal cancer. *Cancer Treat Rev.* 2012; 38(5):451-466.
 59. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 1990; 82(1):4-6.
 60. Fagan JJ, Collins B, Barnes L, D'Amico F, Myers EN, Johnson JT (1998). Perineural invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 124: 637-640.
 61. Yilmaz T, Hosal AS, Gedikoglu G, Onerci M, Gursel B (1998). Prognostic significance of vascular and perineural invasion in cancer of the larynx. *Am J Otolaryngol* 19: 83-88.
 62. El Naggar AK, Dinh M, Tucker S, Luna MA, Goepfert H, Hsu P, Batsakis JG (1996). Genotypic analysis of primary head and neck squamous carcinoma by combined fluorescence in situ hybridization and DNA flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 105: 102-108.
 63. Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, van Blommestein R, Hermans J, van Krieken HH, Cornelisse CJ (2002). DNA ploidy status as a prognostic marker and predictor of lymph node metastasis in laryngeal carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 111: 1015-1020.
 64. Wolf GT, Fisher SG, Truelson JM, Beals TF (1994). DNA content and regional metastases in patients with advanced laryngeal squamous carcinoma. Department of Veterans Affairs Laryngeal Study Group. *Laryngoscope* 104: 479-483.
 65. Westerbeek HA, Mooi WJ, Hilgers FJ, Baris G, Begg AC, Balm AJ (1993). Ploidy status and the response of T1 glottic carcinoma to radiotherapy. *Clin Otolaryngol* 18: 98-101.
 66. Kujawski M, Sarlomo-Rikala M, Gabriel A, Szyfster K, Knuutila S (1999). Recurrent DNA copy number losses associated with metastasis of larynx carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 26: 253-257.
 67. Del Valle-Zapico A, Fernandez FF, Suarez AR, Angulo CM, Quintela JR (1998). Prognostic value of histopathologic parameters and DNA flow cytometry in squamous cell carcinoma of the pyriform sinus. *Laryngoscope* 108: 269-272.
 68. D.P. Bartel, MicroRNAs: target recognition and regulatory functions, *Cell*, 136, 2009.
 69. R.W. Carthew, E.J. Sontheimer, Origins and mechanism of miRNAs, *Cell*, 2009.
 70. Paucheva N., Tavazoie S.F., Control of metastatic progression by microRNA regulatory networks, *Nature Cell Biology*, 2013.
 71. Y. Li, A. Ahmad, D. Kong, et al., Targeting microRNAs for personalized cancer therapy, *Medical Principles and Practice*, 20137.
 72. G.A. Calin, C.M. Croce, MicroRNA signatures in human cancers, *Nature Reviews Cancer*, 2006.

