



**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN
Medicina Molecolare**

**RICERCA DI BIOMARCATORI SALIVARI PER LA
STRATIFICAZIONE DEL RISCHIO IN PAZIENTI
AFFETTI DA CARCINOMA SQUAMOCELLULARE DEL
TESTA - COLLO**

Ciclo XXXVI

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Prisco Mirandola

Tutore:
Chiar.mo Prof. Tito Poli

Dottorando: Dott. Giuseppe Perlangeli

Anni Accademici 2020/2021 – 2022/2023

Alla nostra famiglia

INDICE

0. ABSTRACT.....	5
 1. INTRODUZIONE.....	 8
1.0 Carcinoma del cavo orale.....	8
1.1 Epidemiologia.....	9
1.2 Eziopatogenesi.....	10
1.3 Basi Molecolari del carcinoma del cavo orale.....	12
1.4 Istologia e presentazione clinica.....	14
1.5 Stadiazione e diagnosi.....	15
1.5.1 8° Edizione del sistema TNM	15
1.5.2 Criteri minori di invasività.....	21
1.5.3 “Firme genetiche” nel carcinoma squamocellulare del cavo orale.....	25
1.5.4 Micro RNA.....	27
1.6 Diagnosi.....	28
1.7 Trattamento.....	31
1.8 Follow-up.....	34
 2. MATERIALI E METODI.....	 37
2.0 Proposta di studio.....	37
2.1 Centri coinvolti.....	37
2.2 Obiettivi dello studio.....	38
2.3 Finanziamenti e coperture assicurative.....	38
2.4 Disegno dello studio.....	39
2.5. Popolazione dello studio.....	39
2.5.1 Criteri di inclusione ed esclusione.....	40
2.5.2 Ruolo dei centri partecipanti e flusso delle attività.....	41
2.6 Raccolta dei campioni	41
2.6.1 Flusso di dati	41
2.6.2 Analisi genetica.....	43
2.6.3 Analisi Trascrittomica.....	44
2.6.4 Analisi Radiomica.....	45
2.6.5 Radiomica.....	47

2.6.6 Analisi statistiche.....	48
2.7 “Modified TRIzol lysis protocol”	48
2.7.1 Partecipanti.....	50
2.7.2 Raccolta campioni salivari.....	50
2.7.3 Brushing.....	53
2.7.4 Protocollo di estrazione dell’RNA.....	53
2.7.5 Preelaborazione del campione.....	53
2.7.6 Protocollo TriZol Modificato.....	54
 3. RISULTATI	 56
3.1 Valutazione quantitativa e qualitativa.....	56
3.2 RNA quantity.....	56
3.3 RNA quality	58
3.4 TAqMan Advanced MirnaAssay.....	58
 4. DISCUSSIONE.....	 61
 5. CONCLUSIONI.....	 68
 6. BIBLIOGRAFIA.....	 69
 7. RINGRAZIAMENTI.....	 82

0. ABSTRACT

L'elaborato presentato ha l'obiettivo di dimostrare la necessità di trovare nuove metodiche, come la ricerca di biomarcatori biologici salivari per valutare la prognosi, la sopravvivenza e il rischio di recidiva di pazienti affetti da carcinoma squamocellulare del cavo orale, da utilizzare sia nel periodo di follow-up che in fase preoperatoria.

Questa necessità deriva dall'elevata incidenza e mortalità di questi tumori: sono, infatti, la sesta causa di morte per cancro a livello mondiale, e in Europa la loro incidenza ammonta a 150.000 nuovi casi all'anno, con una mortalità di 70.000 casi all'anno.

Inoltre, una migliore stratificazione aiuterebbe a prendere la giusta decisione terapeutica.

Uno degli istotipi tumorali della regione testa-collo, più grossolanamente stratificati è certamente il carcinoma squamocellulare del cavo orale (OSCC), in particolare quello non correlato all'infezione da HPV (HPV-negativo). Infatti, la sopravvivenza complessiva dei pazienti con OSCC è del 60%, ma varia enormemente (dal 10% all'80%) in relazione alle dimensioni del tumore e alle caratteristiche biologiche. Da ciò si evince che è essenziale al momento della diagnosi differenziare i tumori con un comportamento biologico meno aggressivo da quelli con un comportamento biologico più aggressivo.

I dati raccolti per l'elaborazione della seguente tesi sono stati estratti dalle cartelle di pazienti trattati presso l'Unità Operativa di Chirurgia Maxillo-Facciale di Parma; le informazioni raccolte comprendono il referto istopatologico, la cartella clinica chirurgica e il referto del percorso diagnostico terapeutico assistenziale (PDTA) del paziente. Dalle analisi dei dati emerge come alcune caratteristiche istopatologiche dei campioni operatori siano correlate significativamente alla sopravvivenza del paziente, come il grading e il parametro pT, della stadiazione patologica TNM.

Tuttavia, il sistema di stadiazione utilizzato finora nella pratica clinica (sistema di stadiazione TNM) risulta non sufficiente alla valutazione della sopravvivenza e della stratificazione del rischio di recidiva dei pazienti affetti. Questa limitazione è dovuta principalmente al fatto che

questo sistema di stadiazione non tiene conto né delle caratteristiche individuali del paziente né delle caratteristiche biologiche del tumore. Da qui, nasce l'importanza di trovare nuove metodiche per identificare caratteristiche che possano essere correlate alla presenza o al comportamento di un tumore.

Alcuni dei vantaggi associati a un modello di previsione basato su marcatori biologici possono essere offerti dall'identificazione precoce della neoplasia, consentendo una diagnosi più tempestiva e la scelta di un regime terapeutico più appropriato per un determinato paziente personalizzando la terapia.

Tra i biomarker salivari quelli potenzialmente più importanti per la ricerca del carcinoma orale sono mRNA, microRNA e proteine.

Tuttavia, è importante precisare che i modelli di previsione basati su marcatori biologici devono essere validati accuratamente e integrati con altre informazioni cliniche necessarie per stabilire l'appropriato iter terapeutico.

Ad oggi, non solo è oggetto di studio la ricerca di biomarcatori predittivi specifici e sensibili del carcinoma del cavo orale, ma anche la tecnica con cui ricercarli, indipendentemente dalla metodica di brushing o raccolta salivare.

L'Unità Operativa (UO) di Chirurgia Maxillo-Facciale dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, in collaborazione con il dipartimento di Medicina Sperimentale dell'Ateneo dell'Università degli Studi di Parma, ha avviato uno studio prospettico di raccolta e analisi di campioni di saliva prelevati in pazienti trattati chirurgicamente per carcinoma squamoso del cavo orale e seguiti in programmi di follow-up dalla stessa UO. Lo scopo è quello di identificare dei biomarcatori genetici, in particolar modo miRNA, attraverso il campionamento non invasivo del liquido biologico salivare e la tecnica brushing. Si è deciso che i pazienti reclutati nello studio vengano sottoposti a campionamento salivare e brushing della lesione senza alcun tipo di lavaggio e disinfezione della cavità orale preraccolta. Si ritiene infatti che anche il semplice utilizzo di clorexidina possa alterare la composizione e l'analisi del campione. L'identificazione

di un marker salivare predittivo specifico e sensibile validerebbe un nuovo modello prognostico, utile per migliorare la stratificazione dei OSCC e quindi anche le decisioni terapeutiche che ne derivano.

1. INTRODUZIONE

1.0 Carcinoma del cavo orale

Il carcinoma del cavo orale rappresenta uno dei tumori più frequenti della regione testa-collo.^[1]

La maggior parte dei carcinomi del cavo orale è costituita dal Carcinoma squamocellulare (OSCC), che origina dalle cellule squamose, cellule piatte e sottili che formano il rivestimento del cavo orale. Il tumore è il risultato dell'espansione clonale di una singola cellula precursore che ha subito danni al suo corredo genetico. Le cellule sane perdono il controllo replicativo a causa di mutazioni nei protooncogeni, che promuovono la proliferazione cellulare, geni soppressori che al contrario lo inibiscono, geni regolatori dell'apoptosi e geni coinvolti nella riparazione del DNA. Da questi eventi iniziali si sviluppano lesioni precancerose^{[2][1]}.

Il carcinoma del cavo orale può proliferare in assenza di segnali di crescita, a causa dell'attivazione di protooncogeni. Quelli maggiormente mutati appartengono alla famiglia RAS, BRAF e MYC ed è inoltre presente insensibilità ai segnali inibitori della crescita: i geni oncosoppressori come P53 ed RB sono mutati.

Fisiologicamente P53 interrompe temporaneamente il ciclo cellulare e induce l'invecchiamento e la morte delle cellule con DNA danneggiato.

Nelle cellule tumorali è favorito il metabolismo anaerobico, con un elevato consumo di glucosio e la sua conversione in lattato, che fornisce metaboliti intermedi alle cellule neoplastiche. Questo meccanismo è noto come "effetto Warburg". Inoltre, la crescita delle neoplasie, stimola la neoangiogenesi, si verifica l'inattivazione dell'apoptosi mediante mutazioni nei geni che regolano la morte cellulare programmata e quindi le cellule sviluppano un potenziale replicativo illimitato.

Altre caratteristiche classiche dei tumori maligni sono la capacità di eludere le difese immunitarie e la capacità di invadere e metastatizzare a distanza.

La cascata metastatica vede prima l'invasione della matrice extracellulare, seguita, dalla disseminazione vascolare e infine dall'impianto chiamato "homing" e dalla colonizzazione del nuovo sito^[2].

1.1 Epidemiologia

I carcinomi del distretto testa collo (HNC) rappresentano la sesta causa di morte al mondo, con circa 630.000 nuovi casi (150.000 in Europa) e circa 350.000 decessi ogni anno.

L'età media alla diagnosi è circa 62 anni. Se il tumore viene diagnosticato precocemente la sopravvivenza a 5 anni è dell'85%, altrimenti del 66%. L'incidenza nei soggetti con età inferiore ai 40 anni non esposti a fattori di rischio è in aumento e la patogenesi non ancora del tutto nota.^[1]

Il carcinoma del cavo orale colpisce 2-3 volte di più uomini che donne nella maggior parte dei gruppi etnici.

I paesi con la più alta incidenza sono i paesi del Sud est asiatico, come Pakistan, India, Sri Lanka e Bangladesh, aree dell'Europa occidentale e orientale, Stati Uniti, Sud America e alcune regioni del Pacifico.^[4]

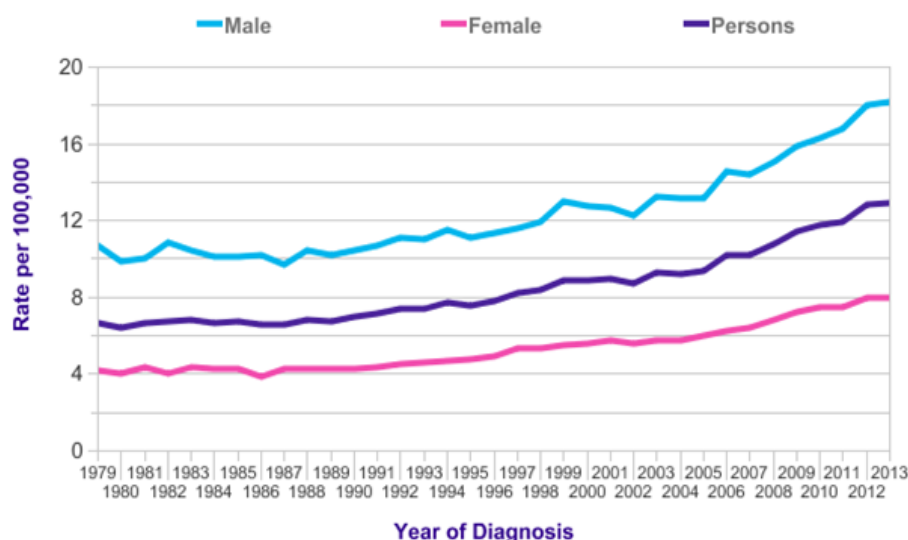


Tabella 1. Tassi d'incidenza Europei standardizzati per età e sesso su 100.000 abitanti.

Fonte: cruk.org/cancerstats

1.2 Eziopatogenesi

La patogenesi del carcinoma del cavo orale è multifattoriale e nel 90% dei pazienti affetti è presente un'anamnesi positiva per fumo e alcol che insieme sembrano avere azione sinergica.^[6]

L'esposizione ai raggi ultravioletti, soprattutto UVB, aumenta il rischio del carcinoma del labbro.^[4]

I raggi ultravioletti possono portare alla comparsa di cheilite angolare, che può avere come evoluzione sfavorevole il carcinoma.

La dieta gioca un ruolo importante nella prevenzione. Il ridotto consumo di frutta e verdura aumenta il rischio di sviluppare la neoplasia, d'altro canto l'introduzione di micronutrienti, come vitamina A, carotenoidi, vitamina C ed E, essendo antiossidanti, riducono il rischio. Anche la scarsa igiene orale, il cattivo stato odontoiatrico e l'ulcerazione cronica causata da protesi incongrue, sembrano favorire il rischio di sviluppare la malattia.^[8]

Gli individui immunocompromessi hanno un rischio maggiore di sviluppare il cancro, così come gli individui più predisposti a non metabolizzare correttamente gli agenti cancerogeni o procarcinogeni o che presentano difetti nei sistemi di riparazione del DNA. La predisposizione genetica è quindi un ulteriore fattore di rischio per l'insorgenza dell'OSCC.^[7]

Inoltre, l'infezione da alcuni ceppi di papilloma virus umano (HPV) è collegata allo sviluppo del carcinoma squamocellulare testa collo, in particolare di quello dell'orofaringe.

I tumori causati dall'HPV sono più frequenti nei giovani, sono localizzati a livello dell'orofaringe e formano un'entità patologica diversa con una prognosi migliore rispetto ad altri tipi di HNSCC HPV-negativi. L'HPV è un virus che agisce attraverso due oncoproteine: E6 ed E7. Queste due proteine portano alla degradazione dei prodotti dei geni P53 e RB, con conseguente perdita di controllo del ciclo cellulare, portando alla sovraespressione dell'inibitore della chinasi ciclina-dipendente P16INK4A.^[6] P16INK4A è il prodotto genetico di CDKN2A e blocca fisiologicamente la fosforilazione di CDK4/ciclina D mediata da RB. I sierotipi di HPV a più alto rischio per lo sviluppo di neoplasia in questo distretto sono il 16,18,31,33,35,39.^[7]

L'EBV causa la leucoplachia orale come lesione preneoplastica e la sua correlazione con il carcinoma del cavo orale non è ancora chiara. Anche le infezioni fungine da *Candida Albicans* sono implicate nello sviluppo di lesioni preneoplastiche.

Le lesioni precancerose associate allo sviluppo del carcinoma a cellule squamose del cavo orale sono la leucoplachia e l'eritroplachia.

La leucoplachia è costituita da chiazze o placche bianche, multiple o singole, con margini definiti che possono formarsi in qualsiasi sito della cavità orale.^[6]

La leucoplachia verrucosa proliferativa è una variante multifocale meno comune con un comportamento più aggressivo. Si tratta di una placca bianca, disomogenea, asintomatica, spesso con superficie cheratosica e verrucosa.^[9]

Si stima che circa il 3% della popolazione mondiale sia affetta da leucoplachia e che il 5-25% di queste lesioni siano prodromiche all'insorgenza del carcinoma. Tutte le leucoplachie dovrebbero essere considerate precancerose fino ad esclusione data dall'esame istologico.

L'eritroplachia è più rara ma con maggior rischio di trasformazione neoplastica. Si presenta come lesione rossa, talvolta erosa con prominenti atipie cellulari. Esiste anche una forma mista di queste lesioni precancerose, che prende il nome di leucoeritroplachia.^[6]

Queste lesioni precancerose originano solitamente nella popolazione tra i 40 e i 70 anni di età e sono principalmente associate all'abitudine al tabacco e al consumo di alcol. La diagnosi precoce di queste lesioni è importante per la sopravvivenza a lungo termine dell'individuo.

In conclusione, ridurre l'esposizione ai fattori di rischio e sottoporsi alla vaccinazione HPV riduce la probabilità di sviluppare un carcinoma del cavo orale. Tuttavia, molti pazienti che non sono esposti a determinanti patologici sono affetti da cancro e la causa sembra essere correlata alla predisposizione genetica.

1.3 Basi Molecolari del carcinoma del cavo orale

La carcinogenesi è determinata dalla trasformazione di un piccolo numero di cheratinociti normali che accumulano varie mutazioni genetiche.

I geni più frequentemente mutati sono TP53, NOTCH1, RB, EGFR, CDKN2A, STAT3 e ciclina D1.^[10]

La progressione della mucosa sana al carcinoma invasivo è mostrata nella figura 1.1.

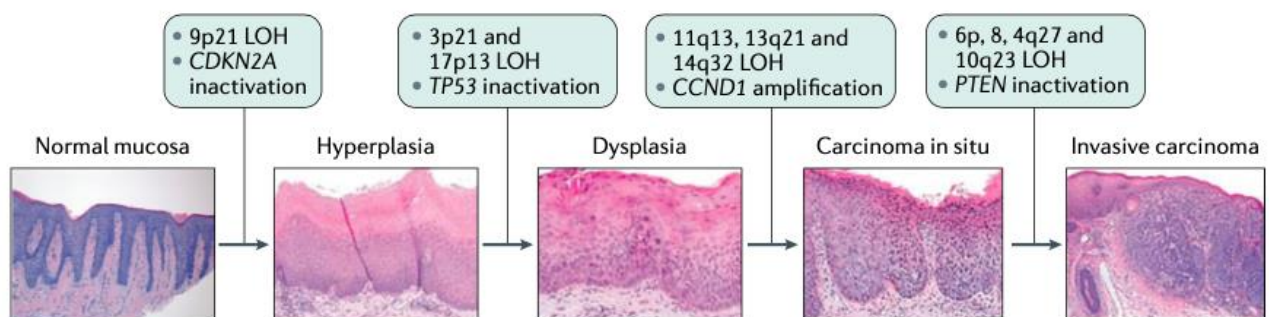


Figura 1.1. Progressione del carcinoma squamoso del distretto testa collo con le relative mutazioni genetiche. Fonte: D. E. Johnson, B. Burtneß, C. R. Leemas, V. Wai Yan Lui, J. E. Bauman, J. R. Grandis, *Head and neck squamous cell carcinoma*, Nature Review, Disease Primers, 6:92, 2020.

Le alterazioni epigenetiche, causate dall'esposizione cronica ad agenti cancerogeni ma anche da infezioni virali e processi infiammatori sono numerose.^[13]

La citochina pro-infiammatoria IL-6 e il suo recettore sono sovra espressi nel carcinoma e sono correlati ad una prognosi peggiore, nonché ad una risposta peggiore a chemio e radioterapia.

Il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) è sovra espresso nell'80-90% dei carcinomi squamocellulari del cavo orale ed è associato ad una sopravvivenza minore, così come la sovra espressione della ciclina D1.^[11]

Una via di segnalazione cellulare che spesso risulta essere mutata e promuove la progressione del tumore è la via PI3K-AKT-mTOR, così come PTEN, regolatore negativo di questa via.^[12]

STAT3 è iper attivato nel tumore e la sua espressione promuove la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, la trascrizione dei fattori di crescita e persino le citochine immunosoppressive.^[4]

Anche il microambiente tumorale gioca un ruolo importante.

Comprende fibroblasti associati al cancro (CAF), cellule immunitarie e altre cellule di supporto. I fibroblasti associati al cancro contribuiscono alla proliferazione cellulare, all'invasione e allo sviluppo di metastasi.

La risposta immunitaria adattativa è soppressa dalla sovra espressione di citochine, incluso il fattore di crescita trasformante (TGF-).^[4]

Ipossia e infiammazione sono alla base dello sviluppo di neoangiogenesi e di alterazioni metaboliche.^[4]

I fattori di crescita dell'endotelio vascolare tra cui VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, promuovono la neoangiogenesi e la linfoangiogenesi e si correlano ad un esito peggiore. L'ipossia induce l'espressione di HIF1. HIF1 promuove l'espressione dei geni che codificano per VEGF e la degradazione della matrice extracellulare. Inoltre, HIF1 promuove la sovra regolazione dei trasportatori del glucosio sulla superficie delle cellule tumorali, favorendone l'ingresso e promuovendo così l'effetto Warburg.

I carcinomi orali a cellule squamose sono riccamente infiltrati di cellule immunitarie, inclusi linfociti T e B, cellule NK, macrofagi, neutrofili, cellule dendritiche e cellule soppressorie di origine mieloide e alcune di queste cellule sono implicate nei meccanismi di evasione immunitaria. La resistenza all'apoptosi è fornita da alterazioni nella via intrinseca, mediata da BCL-2, BAK e BAX. La sovra espressione di BCL-2 è correlata a una prognosi peggiore, al contrario una maggiore espressione di BAK o BAX migliora la prognosi dei pazienti.^[12]

Infine, anche i microRNA a singolo filamento non codificanti, chiamati miR o miRNA, sono implicati nel controllo della crescita e della differenziazione cellulare e sembrano essere alterati

durante la carcinogenesi. Esistono miR con proprietà oncogene (miR-200, miR-155) e miR oncosoppressori.

1.4 Istologia e presentazione clinica

L'esposizione cronica dei cheratinociti a stimoli esterni può causare la perdita dell'omeostasi cellulare, con conseguente sviluppo prima di iperplasia epiteliale poi successivamente di displasia di vario grado, di carcinoma in situ e progressivamente di carcinoma invasivo.

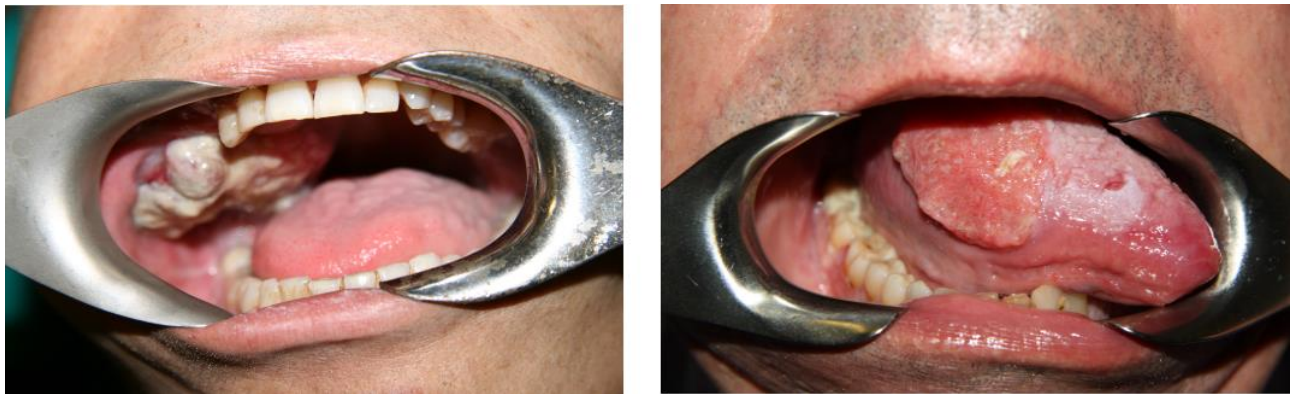


Figura 1.2 a) Carcinoma squamocellulare del mascellare; b) Carcinoma squamocellulare della lingua

I gradi di displasia aumentano con la progressione dell'atipia cellulare dallo strato basale a quello più superficiale. Una cellula atipica è definita come una cellula di dimensioni maggiori e nucleo ipercromico. Le mitosi sono anormali e aumentate di numero e può esserci discheratosi. Nelle fasi iniziali, l'OSCC appare come una placca in rilievo o come un ispessimento della mucosa irregolare, ruvido o verrucoso. Con il tempo si allargano e si presentano come lesioni esofitiche e ulcerate con margini duri e irregolari. Le lesioni possono svilupparsi su precedenti quadri di leucoplachia o eritroplachia. Segni e sintomi associati al tumore non si riscontrano in tutti i pazienti affetti dalla malattia e talvolta si riscontrano in soggetti affetti da altre malattie.

Il segno più frequentemente riscontrato nei pazienti è una lesione del cavo orale o labiale che non guarisce nel tempo.^[1]

Clinicamente, il carcinoma a cellule squamose può presentarsi in tre forme: esofitico, endofitico o ulcerato. Le forme istologiche ben differenziate generalmente sono le forme esofitiche. La forma endofitica può a sua volta essere nodulare o infiltrante. La forma ulcerata è la più comune: si tratta di un'ulcera irregolare con bordi induriti talvolta rilevati. Il fondo dell'ulcera può sanguinare e talvolta essere ricoperto da materiale necrotico. Inoltre, l'OSCC può manifestarsi con sintomi specifici legati all'area in cui si sviluppa: una macchia bianca o rossa sulle gengive, sulla lingua o sulla mucosa del cavo orale, una crescita o un gonfiore del mascellare che diventano fastidiosi e il sanguinamento o il dolore persistente. Altre manifestazioni possono essere tumefazioni a livello cervicale, difficoltà nella masticazione, disfagia, disfonia, dolore mandibolare, disartria, perdita di elementi dentali, alitosi cronica, perdita di peso e astenia negli stadi più avanzati della malattia. Nella maggior parte dei casi l'OSCC è asintomatico nelle fasi iniziali. Pertanto, solo un terzo dei carcinomi squamocellulari viene diagnosticato nelle fasi iniziali. Per questo motivo sono necessari trattamenti più aggressivi, anche se i trattamenti più aggressivi possono portare a maggiori complicanze.

1.5 Stadiazione e diagnosi

1.5.1 8° Edizione del sistema TNM

La classificazione TNM, accettata a livello internazionale come standard per la stadiazione del carcinoma del cavo orale, è stata pubblicata per la prima volta dall'Union for International Cancer Control (UICC) nel 1968.^[16] L'American Joint Committee on Cancer (AJCC) ha presentato una classificazione simile nel 1977 e dal 1987 i due sistemi sono stati unificati.

La classificazione dei tumori in base all'estensione anatomica è fondamentale per determinare il trattamento più appropriato e la prognosi del paziente. Si possono distinguere due tipi di TNM: il cTNM e il pTNM. Le informazioni ottenute dalla valutazione clinica e dalle immagini

consentono la stadiazione clinica, che viene utilizzata per stratificare i pazienti per il trattamento più appropriato. Dopo l'intervento chirurgico, alla luce dell'esame istopatologico effettuato sul pezzo operatorio, può essere effettuata una stadiazione patologica, il pTNM.^[15]

L'acronimo TNM indica tre diversi aspetti dell'estensione del tumore. Il parametro T descrive la sede e la dimensione del tumore primario, il parametro N descrive il coinvolgimento linfonodale e il parametro M descrive la presenza o meno di metastasi a distanza.

Nel 2017 è stata pubblicata l'8° edizione del manuale di stadiazione TNM UICC/AJCC, in cui sono stati introdotti il parametro DOI per il T e il parametro ENE per lo stadio N (tabelle 1.2 e 1.3).^[17]

La profondità di invasione (DOI) viene divisa in superficiale (<5 mm), media (5-10 mm) e profonda (>10 mm). Ogni 5 mm di profondità aumenta il grado di categorizzazione T di un livello.^[18]

Con l'edizione più recente della stadiazione TNM, il parametro T4a non comprende più la tonaca muscolare perché è direttamente incorporato nel DOI in T1, T2, T3.^[19]

Quando si parla di profondità di invasione, non intendiamo lo spessore del tumore.

Per spessore si intende la massima invasione del tumore dalla superficie mucosa, mentre per profondità di invasione si intende la distanza tra la membrana basale della mucosa sana adiacente e il punto più profondo di invasione neoplastica.^[21]

Lo spessore sottostima la potenziale aggressività della neoplasia. Il DOI è quindi un parametro migliore per valutare la prognosi dei pazienti.^[22]

Il DOI potrebbe essere calcolato clinicamente: sebbene sia difficile stimarlo mediante palpazione, può essere stabilito mediante tecniche di imaging come MRI o ecografia.

Tx	Primary tumor cannot be assessed tumors
Tis	Carcinoma in situ

T1	size ≤ 2 cm e DOI ≤ 5 mm
T2	size 2-4 cm e DOI ≤ 10 mm or size ≤ 2 cm e DOI 5-10 mm
T3	size 2-4 cm e DOI >10 mm or size > 4 cm e DOI ≤ 10 mm
T4a	Moderately locally advanced tumor. At the level of the lip, the tumor invades the cortical component of the bone or involves the inferior alveolar nerve, oral floor, or skin. At the level of the oral cavity, the tumor invades only adjacent structures.
T4b	Severely locally advanced tumor. Tumor invades the masticatory space or pterygoid laminae or skull base or incorporate the internal carotid artery.

Tabella 1.2. Stadiazione del tumore primitivo (T) in accordo con ottava edizione del TNM.^[23]

cN (clinical N)		pN (pathological N)	
Nx	Regional lymph nodes cannot be assessed.	Nx	Regional lymph nodes cannot be evaluated.
cN0	Absence of regional lymph node metastasis.	pN0	Absence of regional lymph node metastasis.
cN1	Metastasis in a single ipsilateral	pN1	Metastasis in a single ipsilateral

	lymph node ≤ 3 cm ENE-		lymph node ≤ 3 cm ENE-
cN2a	Metastasis in a single ipsilateral lymph node 3-6 cm ENE-	pN2a	Metastasis in a single ipsilateral lymph node ≤ 3 cm ENE+ Or Metastasis in an ipsilateral lymph node 3-6 cm ENE-
cN2b	Metastasis in multiple ipsilateral lymph nodes ≤ 6 cm ENE-	pN2b	Metastasis in multiple ipsilateral lymph nodes ≤ 6 cm ENE-
cN2c	Metastasis in bilateral or contralateral lymph nodes ≤ 6 cm ENE-	pN2c	Metastasis in bilateral or contralateral lymph nodes ≤ 6 cm ENE-
cN3a	Metastasis in a lymph node > 6 cm ENE-	pN3a	Metastasis in a lymph node > 6 cm ENE-
cN3b	Metastasis in one or more lymph nodes ENE+	pN3b	Metastasis in a lymph node > 3 cm ENE+ Or Metastasis in multiple ipsilateral or contralateral or bilateral lymph nodes ENE+

Tabella 1.3. Stadiazione dei linfonodi locoregionali (N) in accordo con ottava edizione del TNM. La dicitura "U" o "L" può essere usata per ogni N per indicare metastasi sopra(U) o sotto(L) il margine inferiore della cartilagine cricoidea.

Il parametro Estensione extranodale (ENE) nella categoria N indica la diffusione metastatica delle cellule tumorali da un linfonodo, attraversando la sua capsula fibrosa al tessuto connettivo circostante, indipendentemente dal fatto che sia presente o meno reazione stromale.^[24] (Tabella 1.2)

Il parametro ENE può essere a sua volta distinto in ENEmi (ENE microscopico), quando l'estensione è <2 mm, ed ENema (ENE macroscopico) quando l'estensione è >2mm o è visibile ad occhio nudo dall'anatomopatologo.^[23]

Può essere fatta anche una diagnosi clinica di ENE+, quando esistono dati clinici di invasione cutanea, invasione dei nervi cranici con alterazioni funzionali e multipli linfonodi confluenti, supportati anche da reperti radiologici.^[18]

Dal punto di vista prognostico, l'estensione extranodale è associata ad un aumentato rischio di recidiva locoregionale e metastasi a distanza. L'inclusione dei parametri DOI ed ENE ha consentito una migliore stratificazione dei soggetti affetti dal tumore e l'upstaging delle classificazioni pT e pN ha comportato una prognosi peggiore per questi pazienti, con una sopravvivenza globale e una sopravvivenza libera da malattia ridotte.^[27]

Il parametro M si distingue semplicemente in M0 quando le metastasi a distanza sono assenti e M1 quando sono presenti.^[23]

Queste due variabili sono state incluse nell'ottava edizione del sistema di stadiazione AJCC (2017).

In breve, la categoria dello Stadio clinico I viene ampliata per includere T0-T2 con la malattia cN0-N1, mentre la malattia T3 o cN2 passerebbe allo Stadio clinico II e la malattia T4 o cN3 passerebbe allo Stadio clinico III. Allo stesso modo T0-T2 con malattia pN0-N1 è considerato Stadio patologico I, tuttavia, lo Stadio patologico II è riorganizzato per includere T3-T4 con condizioni pN0-N1 e T0T2 con condizioni pN2 e lo Stadio patologico III è limitato a T3-T4 con malattia pN2. Da notare che la malattia clinica e patologica allo stadio IV è determinata solamente dalla presenza di metastasi a distanza (M1) e la patologia N3 non esiste più. Rispetto

alla settima edizione del TNM, l'8° edizione riesce a differenziare meglio la sopravvivenza libera da malattia tra i vari stadi T e i vari stadi della malattia.

Un sistema di stadiazione impreciso può stratificare erroneamente i pazienti, portando ad un approccio terapeutico inappropriato. L'ultima edizione del TNM, introducendo parametri oggettivi facilmente misurabili come DOI ed ENE, definisce in modo più accurato la prognosi dei pazienti, a differenza della settima edizione.^[20]

Change	7th Ed. (2010)	8th Ed. (2017)		
		Oral Cavity	HPV- Oropharynx	HPV+ Oropharynx
T-stage	T0: no primary T1: size ≤2cm T2: size 2-4cm T3: size >4cm T4: ○ T4a: moderately advanced (extrinsic tongue muscle involvement constituted T4a) ○ T4b: very advanced	• T0 deleted • T1: size ≤2cm and DOI ≤5mm • T2: size ≤2cm and DOI 5-10mm or size 2-4cm and DOI ≤10mm • T3: size >4cm or >10mm DOI • T4a extrinsic tongue muscle infiltration now deleted	• T0 deleted	• T0 if proven p16+ disease without evidence of primary tumor • All locally advanced combined to T4
	N0: no LN involved N1: single ipsi LN ≤3cm in size N2: ○ N2a: single ipsi LN, 3-6cm in size ○ N2b: multiple ipsi LNs, all ≤6cm in size ○ N2c: any bi or ctr LNs, all ≤6cm in size N3: any LN >6cm in size	Clinical N-stage		
		• N1-N2 is same as previous and ENE(-) • N3 now with subcategories: ○ N3a is previous N3 (size >6cm) and ENE(-) ○ N3b is any ENE(+), either clinical or radiographic		• Previous N1, N2a combined to N1 (≤6cm with or without ENE) • Previous N2b, N2c combined to N2
		Pathological N-stage		
Stage grouping	Clinical or pathological TNM used for same grouping system	• Microscopically evident ENE(+) LNs results in upstaging		• N1: ≤4 LNs involved • N2: >4 LNs involved • N3 deleted
		Same as previous		Separate clinical and pathological TNM groupings

Tabella 1.4. Confronto tra 7° ed 8° edizione AJCC per la stadiazione di OSCC e OPSCC
 DOI =profondità di invasione; LN =linfonodi; ENE (+) = estensione extranodale presente;
 ENE (-) = estensione extranodale assente; ipsi = ipsilaterale, bi = bilaterale, ctr = contralaterale

Con l'ottava edizione del TNM è stata introdotta anche una nuova classificazione dei carcinomi orofaringei HPV- positivi, poiché la precedente edizione si era rivelata inadeguata nel predire l'outcome di questi pazienti.^[16]

1.5.2 Criteri minori di invasività

Altri criteri minori di invasività che rappresentano importanti fattori prognostici, oltre ai parametri ENE e DOI, sono lo stato dei margini alla resezione e l'invasione perineurale (PNI) e linfovaskolare (LVI). Sia l'invasione perineurale che quella linfovaskolare dovrebbero essere sottoclassificate in invasione intratumorale o extratumorale, focale o multifocale.^[23]

L'individuazione di PNI e LVI dipende da fattori oggettivi, come lo stadio del tumore e la sede di sviluppo, ma anche da fattori soggettivi, tra cui il numero di aree selezionate per l'esame macroscopico e la capacità di riconoscere la loro presenza da parte dell'anatomopatologo durante l'esame microscopico del campione.^[25]

Nell'invasione linfovaskolare possono essere presenti aggregati di cellule tumorali nello spessore endoteliale dei vasi o invasione della tonaca media con ulcerazione dello strato interno. In alternativa potrebbero esserci cellule tumorali associate a trombi di fibrina depositati vicino alla parete del vaso.^[25]

Il PNI è il tropismo delle cellule tumorali per i nervi adiacenti al tumore: negli stadi più avanzati della neoplasia vi è una forte tendenza all'invasione dei nervi.^[26]

Nello studio condotto da Barrett et al., sono state dimostrate le associazioni tra PNI e i parametri pT e pN, analogamente LVI con il parametro pT nei carcinomi a cellule squamose della lingua.^[25]

LVI è un buon strumento prognostico ed è correlato ad aumento del rischio di recidiva e a tassi di sopravvivenza più bassi.^[26]

Lo studio di Jarmin et al., in accordo con la letteratura, mostra che alti tassi di PNI sono correlati con percentuali di sopravvivenza significativamente peggiori nei pazienti con malattia in stadio

avanzato trattati con chirurgia radicale e terapia neoadiuvante Figura 1.3). Ha inoltre dimostrato che la PNI è un predittore indipendente per la sopravvivenza globale e la sopravvivenza libera da malattia negli stadi III e IV nei carcinomi della lingua e del pavimento orale.^[26]

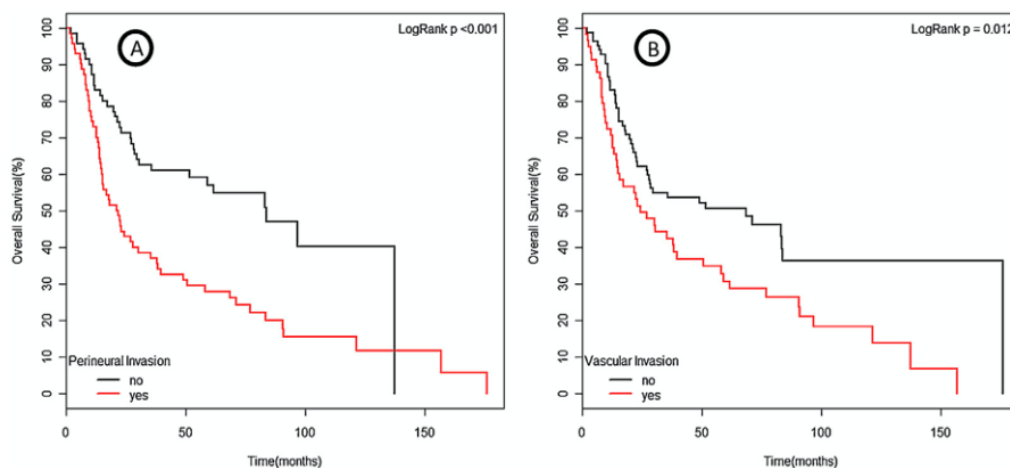


Figura 1.3. Sopravvivenza globale nei pazienti con presenza o assenza di invasion perineurale (A) e invasione linfovaskolare(B).

Fonte: J. F. Jardim, A. L. N. Francisco, R. Gondak, A. Damascena, L. P. Kowalski, *Prognostic impact of perineural invasion and lymphovascular invasion in advanced stage oral squamous cell carcinoma*, International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery, vol.44, p. 23-28, 2015.

Lo studio condotto da Ting et al, concentrandosi sui casi in stadio T3 e T4 provenienti da vari siti orali, ha dimostrato che la doppia positività di PNI e LVI è un buon predittore prognostico. Questi due parametri, quando presenti, predicono indipendentemente la presenza di metastasi ai linfonodi cervicali e distanti, e anche una riduzione della sopravvivenza correlata alla malattia. Inoltre, lo studio suggerisce come questi fattori potrebbero essere potenzialmente utilizzati in futuro come marcatori per la terapia adiuvante nei pazienti a più alto rischio di metastasi a distanza.^[28]

Lo studio di Chen et al, condotto nel 2013, aveva dimostrato che la presenza di invasione perineurale e linfovaskolare negli stadi iniziali (I e II) del carcinoma orale a cellule squamose non vede la necessità per i pazienti di sottoporsi a trattamento radioterapico adiuvante.^[29]

Quando parliamo di margini di resezione, intendiamo margini puliti quando la resezione avviene ad almeno 5 mm di distanza dal tumore. Se la distanza risulta <1mm i margini di resezione sono

positivi. Un margine di resezione adeguato è correlato con un aumento della sopravvivenza e una riduzione della recidiva locale, al contrario, un margine positivo vede la necessità di effettuare terapia adiuvante.^[30]

Già nel 2005, lo studio di Brandwein-Gensler et al, ha valutato in che modo lo stato dei margini di resezione influisse sull'esito dei pazienti con OSCC. Lo studio ha dimostrato che la resezione del tumore con margini adeguati può ancora, in determinate circostanze, non prevenire lo sviluppo di recidive locali e che anche la modalità di invasione del tumore può svolgere un ruolo importante. Tuttavia, secondo Brandwein-Gensler, i pazienti che sono a basso rischio di recidiva, ma nei quali i margini di resezione risultano inadeguati dovrebbero essere trattati con una nuova resezione piuttosto che con la radioterapia adiuvante.^[31]

Uno studio sudcoreano più recente ha cercato di comprendere gli effetti che un margine di resezione >5mm(cSM5) potesse avere sul rischio di recidiva locale. Dai dati raccolti in pazienti con OSCC sottoposti a resezione chirurgica come primo trattamento, è emerso che il CSM5 rappresenta un indicatore del rischio solo nei casi di cancro orale in stadio più avanzato (II-IVa), negli stadi più avanzati di malignità sCM5 può aumentare il rischio di morbidità e quindi il reale beneficio da un punto di vista oncologico è ambiguo.^[32]

Infine, lo studio retrospettivo condotto da Szewczyk et al, ha valutato 261 pazienti sottoposti a resezione chirurgica con margini di resezione >1 cm in cui si è verificata una recidiva del tumore. I soggetti con determinati criteri di ammissibilità (stadio T iniziale; N0, margini di resezione negativi e nessuna radioterapia adiuvante), hanno ricevuto un trattamento chirurgico di salvataggio, una procedura spesso non eseguita a causa del suo impatto negativo sulla qualità della vita del paziente e dell'altrimenti alto rischio di recidiva successiva.

Lo scopo dello studio era quello di determinare i fattori legati allo sviluppo della recidiva e al successo dell'intervento chirurgico di salvataggio.

È stato dimostrato che lo stato dei margini negativi rappresenta l'unico parametro significativamente correlato ad un risultato migliore (Figura 1.4). Inoltre, tutti gli altri parametri,

inclusi N+, ENE+, presenza di PNI, LVI e margini di resezione positivi, sono correlati alla recidiva della malattia.^[33]

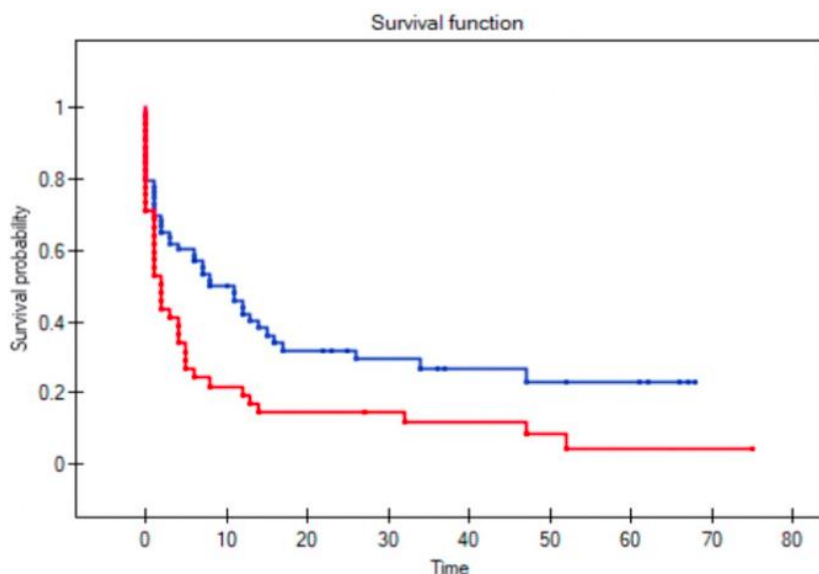


Figure 1.4. Curva di sopravvivenza in pazienti con recidiva di carcinoma orale; margini negativi dopo chirurgia (linea blu), contro margini positivi (linea rossa).

Fonte: M. Szewczyk, P. Golusinski, J. Pazdrowski, W. Golusinski, *Prognostic Factors associated with Successful Salvage Surgery in Recurrent Oral Cancer*, Diagnostics, MDPI, Vol.11p. 1-12, 2021.

La stadiazione TNM non considera altri importanti fattori prognostici, come le comorbidità e il trattamento. Lo stato di salute generale del paziente e la concomitante presenza di altre malattie sono fattori di cui tenere conto per la prognosi.^[23] Più che l'età del paziente va valutato il suo performance status: l'aumento della vulnerabilità e l'età avanzata possono rendere i trattamenti meno tollerabili o diminuire l'efficacia.^[34]

In definitiva, la stadiazione TNM è tuttora piuttosto grossolana per prevedere la risposta al trattamento non chirurgico e per stratificare meglio il rischio di sviluppare OSCC primario o recidiva, motivo per cui si è vista la necessità di identificare possibili biomarcatori specifici di questa malattia.^[4]

1.5.3 “Firme genomiche” nel carcinoma squamocellulare del cavo orale

I carcinomi squamocellulari testa-collo sono tumori estremamente eterogenei sia dal punto di vista anatomopatologico che da quello genetico. Questa eterogeneità spiega l’ampia variabilità del comportamento biologico e della risposta alla terapia. I modelli prognostici spesso considerano solo le caratteristiche cliniche del tumore, ma per la medicina di precisione, il profilo molecolare e genomico del tumore sono fondamentali per fornire il trattamento adeguato a ciascun paziente. I tumori che condividono lo stesso stadio patologico TNM rivelano una notevole eterogeneità dal punto di vista molecolare, che si traduce in variazioni negli esiti della malattia.^[20]

L’analisi genomica, attraverso una tecnologia ad alto rendimento, ha fornito ai ricercatori indicazioni dell’influenza dei geni sul comportamento dell’HNSCC e sulla risposta alla terapia e, per la prima volta, è stato proposto un tentativo di definire nuovi sottotipi di cancro molecolari. Quindi la “firma genomica” deriva dalla valutazione dell’espressione genica.^[31]

Considerando il comportamento biologico dei tumori sarebbe utile applicare una “firma genomica” in grado di predire la recidiva locale, la malattia locoregionale e metastatica a distanza.

Ad esempio, se i predittori molecolari dimostrassero un alto rischio di malattia metastatica, a partire dalla discussione multidisciplinare preoperatoria potremmo considerare la chemioterapia adiuvante come parte del trattamento. D’altro canto, i pazienti ad alto rischio di fallimento locale potrebbero necessitare di radioterapia intensificata. Inoltre, la capacità di prevedere la resistenza alle radiazioni da sola o in combinazione con la chemioterapia, rimane un importante obiettivo clinico.^[20]

Le “firme genomiche” potrebbero anche essere utili per valutare la presenza di metastasi locoregionali e a distanza. Queste sono la principale causa di decesso in questi pazienti: la presenza o assenza di metastasi determina principalmente la sopravvivenza all’HNSCC.

L'identificazione della malattia metastatica, quindi, ha un impatto importante sulla scelta del piano di trattamento. Tuttavia, poiché la metastatizzazione coinvolge più passaggi, ognuno dei quali è sotto l'influenza di meccanismi regolatori, è improbabile che un singolo fattore svolga il ruolo decisivo, ma che al contrario molti geni siano coinvolti.^[15]

Quindi, sebbene siano stati compiuti progressi nell'inquadramento e trattamento e del cancro grazie all'analisi genomica, importanti questioni rimangono irrisolte. I ricercatori concordano sull'opportunità di indagare ulteriormente le potenziali soluzioni fornite dall'analisi integrata di dati biomolecolari, genetici e clinici per ottenere una visione molecolare olistica dei processi patogenetici, personalizzare le terapie dei pazienti e sviluppare tecnologie sofisticate per trasferire la diagnostica basata sui geni nella realtà clinica.^[15]

Come è ampiamente noto, le vescicole extracellulari (EV) rappresentano uno dei principali meccanismi di comunicazione intercellulare. La scoperta di EV di derivazione cellulare nella saliva in grado di "stoccare" selettivamente fattori come DNA, RNA, miRNA e proteine, ha recentemente attirato l'attenzione dei ricercatori, essendo promettenti fonti aggiuntive di biomarcatori.^[56]

Molti studi hanno dimostrato che gli EV, trasferendo proteine e acidi nucleici in grado di supportare o inibire la tumorigenesi, sono implicati nei microambienti tumorali; inoltre, è stato recentemente dimostrato che gli EV possono avere un ruolo nei tumori orali. Differenze nella dimensione, nei proteomi e nell'espressione dei marcatori esosomiali sono state messe in rilievo tra le cellule parentali dell'OSCC e le cellule metastatiche, inoltre, le cellule parentali rilasciano esosomi con marcatori oncogeni in grado di influenzare il microambiente tumorale circostante. La valutazione dei marcatori esosomiali di questi pazienti può supportare la diagnosi, la prognosi e la valutazione della risposta del paziente alla terapia, rilevando la potenziale recidiva del tumore.^[56]

Ad oggi, pochi studi hanno valutato il ruolo degli EV salivari nella gestione dell'OSCC. Gli esosomi salivari derivati dal tumore hanno caratteristiche morfologiche e molecolari diverse

rispetto a campioni di saliva sana e possono rilevare precocemente il cancro e le trasformazioni maligne nei soggetti ad alto rischio. Nel confronto dell'analisi proteomica della saliva intera di pazienti sani e pazienti con OSCC, è stato dimostrato che le caratteristiche quantitative degli EV della saliva possono supportare la diagnosi e fornire informazioni sulla prognosi. Il proteoma delle EV salivari mostra la presenza di proteine implicate nella risposta infiammatoria del cancro e nella crescita e proliferazione cellulare, consentendo la classificazione dei pazienti OSCC e la capacità di fornire informazioni sulla prognosi con alta percentuale di accuratezza.^[57]

1.5.4 MicroRNA

I microRNA sono piccole molecole di RNA a filamento singolo (19-21 nucleotidi), trascritte dall'RNA polimerasi cellulare e sottoposte a un doppio taglio sequenziale: nel nucleo (miRNA primario) e nel citoplasma (miRNA precursore). A seconda del livello di complementarità con il bersaglio, scindono un RNA messaggero(mRNA) o ne inibiscono la traduzione.^[56]

I microRNA possono essere rilasciati nei fluidi corporei come miRNA privi di cellule, associati a proteine che legano l'RNA o confezionati selettivamente in EV. Il loro coinvolgimento nei microambienti tumorali è stato ampiamente studiato, dimostrando che l'espressione dei miRNA potrebbe essere associata alla deregolamentazione dei geni oncosoppressori o degli oncogeni, contribuendo allo sviluppo o inibizione del tumore. Essi rimangono invariati nei tessuti e nei fluidi corporei e la loro espressione è spesso tumore-specifica; per questi motivi, la possibilità di analizzare i profili di miRNA associati ai pazienti affetti da cancro orale rappresenta un nuovo paradigma nella scoperta di biomarcatori per la diagnosi clinica. Nello specifico, per quanto riguarda i tumori del testa-collo strettamente associati alla saliva, la valutazione dei miRNA rilasciati dalle cellule dell'OSCC nella saliva stessa rappresenta una prospettiva promettente per la gestione di queste neoplasie.

Le diverse espressioni salivari di miRNA, come miR-125, miR-200a;miR21,miR-145;miR93,miR-184 nei pazienti con OSCC rispetto ai soggetti sani, si è dimostrato un metodo affidabile per rilevare il carcinoma e lesioni orali potenzialmente maligne.

È stato anche appurato che il miR-139-5p salivare è un prezioso biomarcatore per la risposta alla terapia e la valutazione della recidiva dell'OSCC. Anche altri studi si sono concentrati sul potenziale dei miRNA salivari per valutare il rischio di progressione delle lesioni precancerose orali in OSCC, distinguendo la displasia orale di basso grado in progressione da quella non in progressione. Nonostante le evidenze sul ruolo dei miRNA siano incoraggianti si suggerisce che una combinazione di questi ultimi e di dati proteomici potrebbe essere utile per avere maggior solidità dei risultati.^[56]

1.6 Diagnosi

I carcinomi del cavo orale vengono diagnosticati nel 50% dei casi in uno stadio avanzato (III o IV) e la maggior parte dei pazienti è asintomatica nelle fasi iniziali della malattia.^[35]

La comparsa di una lesione orale e alcuni sintomi come dolore durante la masticazione e l'eloquio impacciato allertano il paziente.

T Category	N Category	M Category	Stage Group
Tis	N0	M0	0
T1	N0	M0	I
T2	N0	M0	II
T3	N0	M0	III
T1, T2, T3	N1	M0	III
T4a	N0, N1	M0	IVA
T1, T2, T3, T4a	N2	M0	IVA
Any T	N3	M0	IVB
T4b	Any N	M0	IVB
Any T	Any N	M1	IVC

Tabella 1.5. AJCC (8° Edizione) Gruppi di stadi prognostici per carcinomi squamocellulari HPV -.
A. Panwar, E. Interval, W. M. Lydiatt, «*Emergence of a Novel Staging System for Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma Based on HPV Status: Page 2 of 2*», Oncology Journal, Head & Neck Cancer, 2017 Dec 15th.

I primi passi da compiere per la diagnosi sono un'anamnesi approfondita, alla ricerca di eventuali fattori di rischio, ispezione del cavo orale e della lesione.^[1]

La visita prevede l'esame clinico ed endoscopico delle vie aeree digestive superiori, la palpazione delle stazioni linfonodali del collo e la valutazione dello stato funzionale dei nervi cranici, delle ghiandole salivari e della tiroide.^[18]

La diagnosi certa viene effettuata mediante biopsia della lesione primaria e/o di qualsiasi massa cervicale riscontrata mediante l'esecuzione di agoaspirato, affinché l'anatomopatologo possa analizzarla.^{[12][1]}

La biopsia incisionale è la tecnica che viene preferita nella maggior parte dei casi e viene eseguita al margine della lesione con tessuto sano ed una profondità adeguata a valutare l'invasione tumorale della lamina propria.^[36]

Un esame istopatologico può distinguere un tumore ben differenziato, in cui sono evidenti le "perle di cheratina", da uno scarsamente differenziato, con cellule immature e mitosi atipiche.

GX	The degree of differentiation cannot be determined.
G1	Well-differentiated cancer.
G2	Moderately differentiated cancer.
G3	Poorly differentiated cancer.

Tabella 1.6. Grading istologico

Un'altra tecnica biotica, in questo caso non invasiva, è la biopsia orale mediante brushing: utilizzando uno scovolino si prelevano cellule di sfaldamento dalla zona sospetta. Qualora si riscontrassero cellule neoplastiche sarà necessario eseguire una biopsia tradizionale per conferma.^[1]

Dopo la conferma diagnostica all'esame istopatologico, vengono eseguite tecniche di indagini per la stadiazione clinica del tumore. La TC e la RM testa collo sono utili per stabilire l'estensione della malattia a livello locoregionale. La TC torace è utile per escludere la presenza di metastasi a distanza. Quando possibile, la PET-CT è preferibile per la stadiazione metastatica a distanza nei pazienti con tumore localmente avanzato o con interessamento linfonodale.^[12]

La PET-CT consente anche la valutazione funzionale del tumore: il radiotracciante viene captato dalle cellule con metabolismo aumentato.^[36]

La RM valuta l'infiltrazione dei tessuti molli; l'infiltrazione della componente midollare di mascellare e mandibola e il possibile coinvolgimento neuronale o perineurale.^[36]

Tuttavia, la TC si lascia preferire alla RM nel mostrare l'erosione della componente corticale dell'osso.^[23]

L'esecuzione di un esame ecografico consente anche una buona valutazione del coinvolgimento dei linfonodi cervicali. Le tecniche di imaging non sono sufficienti per identificare le micrometastasi dei linfonodi cervicali che risultano essere al di sotto del potere risolutivo della metodica, così come anche l'agoaspirato con ago ecoguidato presenta dei limiti, dipendenti dall'esperienza dell'ecografista e del patologo.

La biopsia del linfonodo sentinella è un metodo diagnostico frequentemente utilizzato per la stadiazione del carcinoma a cellule squamose della cavità orale. Il linfonodo sentinella si riferisce alla prima stazione linfonodale drenante e quindi un importante sito di metastasi nel caso in cui il tumore abbia iniziato a diffondersi attraverso il sistema linfatico.^[37]

Per rilevare il linfonodo sentinella, un radiotracciante, ovvero il tecnezio-99(Nanocoll), viene iniettato nell'area peritumorale. Successivamente con la linfoscintigrafia, si localizza la sede del linfonodo sentinella. Una volta individuato, viene rimosso chirurgicamente ed eseguita analisi istopatologica. Se vengono riscontrate metastasi si effettua un trattamento chirurgico (SLC modificato tipo III) entro 30 giorni dal primo intervento, altrimenti non si effettua alcun trattamento e si adotta un approccio "Wait and See".^[38]

Nell'ultimo decennio sono stati compiuti sforzi anche per identificare biomarcatori nella saliva per aumentare la possibilità di diagnosi precoce del cancro e per identificare lesioni maligne o precancerose quando il paziente è ancora asintomatico.

1.7 Trattamento

Il trattamento del carcinoma orale si basa sulla resezione chirurgica della lesione, talvolta combinata con radioterapia adiuvante e/o chemioterapia (Figure 1.5 e 1.6).

L'indicazione al trattamento adiuvante è influenzata da diversi fattori riscontrati all'esame istopatologico del pezzo operatorio. Questi fattori includono la differenziazione cellulare, il modello di crescita, la profondità di invasione (DOI), lo stato dei margini, l'invasione vascolare e neuronale, l'infiltrazione ossea, la stadiazione pTNM e lo stato dei linfonodi. Per quanto riguarda i linfonodi si valuta il numero di linfonodi infiltrati, la dimensione delle metastasi maggiori e l'estensione extranodale.^[17]

Il trattamento del carcinoma orale è un trattamento multidisciplinare, in cui la prima cosa da valutare è se il paziente è candidabile per un trattamento curativo o palliativo. Il trattamento curativo consiste nell'intervento chirurgico per la rimozione del tumore primario e degli eventuali linfonodi metastatici. I trattamenti potenzialmente curativi sono la chirurgia combinata con terapia adiuvante, radioterapia o chemioterapia. Se il carcinoma ha già metastatizzato a distanza o non è resecabile chirurgicamente per infiltrazione di strutture vitali, il paziente è candidato a terapia palliativa.^[36]

Il trattamento del carcinoma del cavo orale ha come obiettivo primario l'eradicazione del tumore e consiste in una parte demolitiva seguita da quella ricostruttiva. L'intervento di demolizione comprende la resezione del tumore, la dissezione cervicale e l'esecuzione di una tracheotomia per garantire la pervietà delle vie aeree. La resezione del tumore deve essere eseguita rispettando i margini microscopici del tessuto sano normale di almeno 5 mm. La dissezione cervicale comporta la rimozione dei livelli dei linfonodi cervicali. È possibile eseguire differenzi

dissezioni del collo; la dissezione radicale, la dissezione radicale modificata (in caso di sacrificio o meno di alcune strutture anatomiche) o la dissezione selettiva.^[36]

La biopsia del sentinella è un metodo diagnostico frequentemente utilizzato per la stadiazione dei carcinomi del cavo orale. Il linfonodo sentinella è il primo linfonodo drenante della neoplasia e quindi importante sede di metastasi nel caso in cui il tumore abbia iniziato a diffondersi per via linfatica.^[37]

Per rilevare il linfonodo sentinella viene utilizzato 99-Tc iniettato nell'area peritumorale e successivamente con la linfoscintigrafia si localizza la sede del linfonodo. Una volta individuato viene rimosso chirurgicamente ed analizzato. Se non vengono riscontrate metastasi si effettua follow-up del paziente se invece vengono riscontrate, si effettua trattamento chirurgico e/o radioterapico anche a livello cervicale.

La radioterapia adiuvante è spesso indicata dopo il trattamento chirurgico, è una terapia locale che utilizza radiazioni ionizzanti per danneggiare e distruggere le cellule tumorali. Viene utilizzata sia sul tumore primario, sia sul collo. A diversi dosaggi, può essere utilizzata sia per scopi curativi che palliativi.^[36]

Il trattamento chemioterapico è raccomandato nei pazienti con stadio avanzato T3-T4, con coinvolgimento di uno o più linfonodi ENE+. Il regime chemioterapico standard è cis-platino alla dose 100mg/m² ogni 3 settimane.^[12]

La chemioterapia di induzione può essere utilizzata per ridurre il volume del tumore o per controllare la malattia quando non è possibile inviare immediatamente il paziente all'intervento chirurgico.^[12] Anche il Cetuximab, un anticorpo monoclonale che inibisce EGFR, viene comunemente usato.^[36]

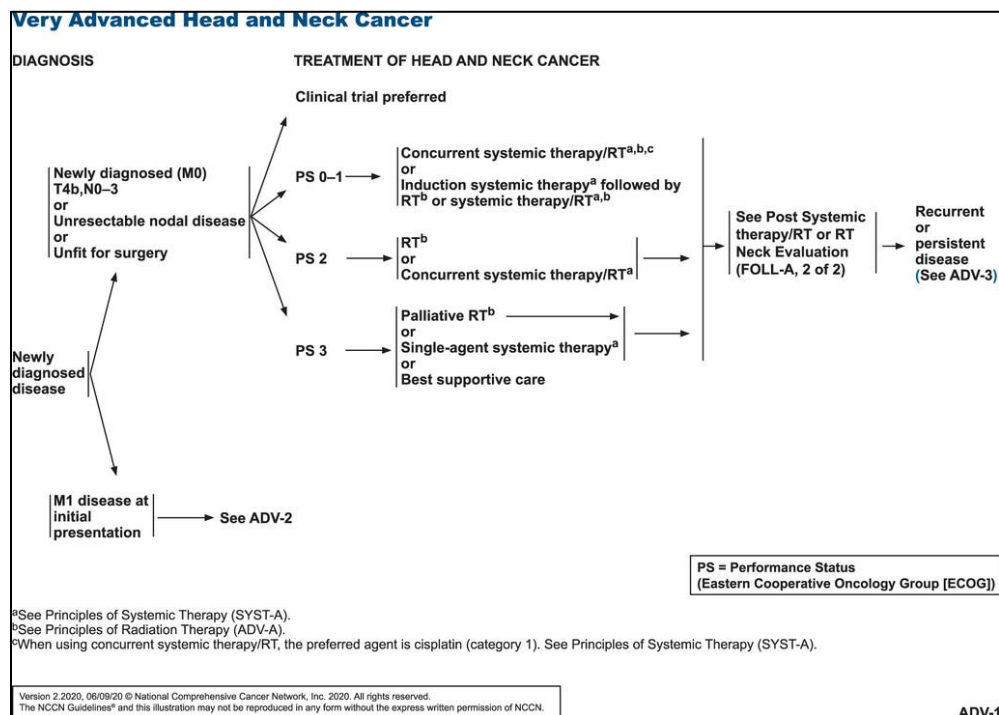


Figura 1.5. Flowchart di tumori testa-collo di nuova diagnosi.

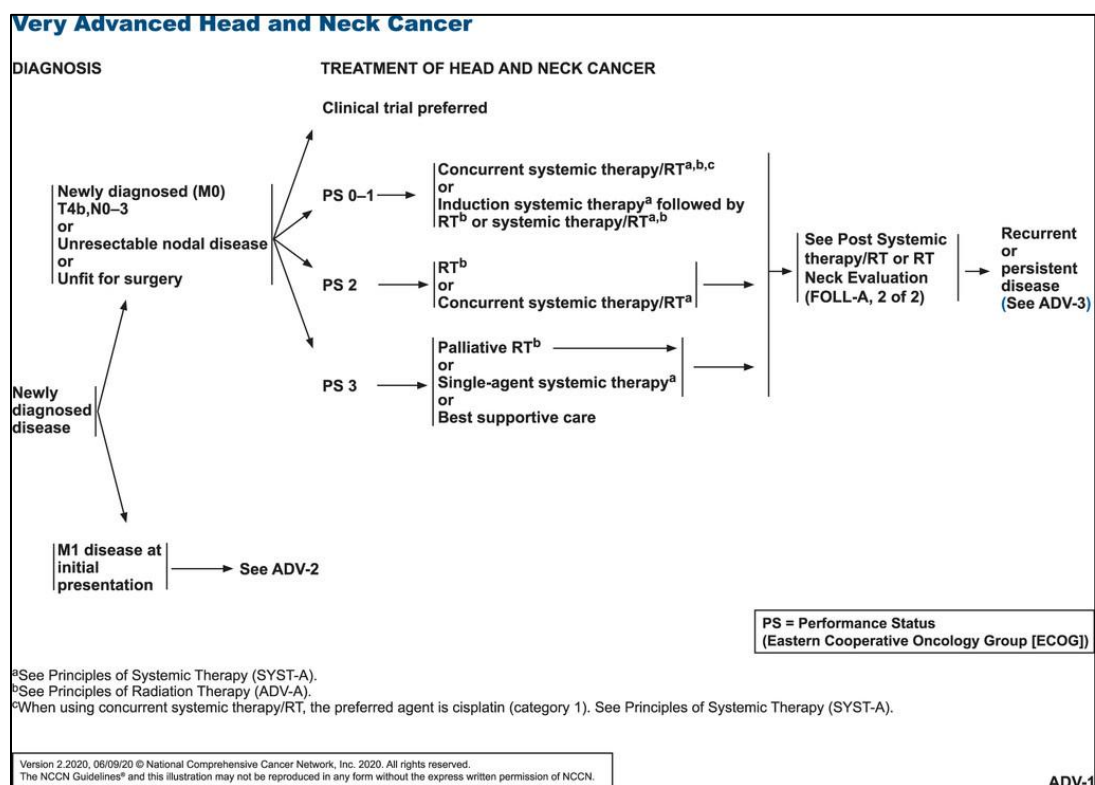


Figura 1.6. Trattamento della malattia metastatica all'esordio.

1.8 Follow-up

Dopo il trattamento, i pazienti vengono inseriti in un programma di follow-up il cui scopo è quello di intercettare precocemente la ripresa della malattia quando ancora asintomatica.^[42]

Lo sviluppo di metastasi e recidive dopo trattamento è un evento frequente nei pazienti con OSCC.^[43]

Il follow up dovrebbe essere un percorso adattato al singolo paziente, prendendo in considerazione l'alto o il basso rischio di sviluppare una nuova malattia e consentendo la valutazione della risposta al trattamento e l'eventuale insorgenza di morbidità associate. I pazienti devono essere educati a riconoscere i sintomi legati ad una nuova malattia, soprattutto dopo la sospensione del follow-up.^[42]

Un limite degli attuali percorsi di follow-up è che le linee guida non sono sito-specifiche: il follow-up risulta simile per tutti i tumori del testa-collo. Questo tipo di modello non è accurato, perché sebbene le cause, la prognosi e il trattamento siano diversi per i tumori in sedi anatomiche diverse, il follow-up è simile; perdendo la possibilità di personalizzare il percorso.^[40]

Il monitoraggio dei pazienti subito dopo il trattamento è finalizzato a rilevare eventuali effetti collaterali del trattamento stesso. Con il tempo, tuttavia, il rilevamento delle recidive diventa sempre più importante. La diagnosi precoce di nuove malattie presenta vantaggi in termini di cura, sopravvivenza e qualità della vita.^[42]

Le visite di follow-up consentono inoltre di valutare gli effetti del trattamento sulla qualità di vita del paziente attraverso la somministrazione di questionari sulla QoL prima dell'inizio del trattamento e durante il trattamento.^[18]

Il rischio di recidiva è stimato al 40-60% nei pazienti con tumore maligno localmente avanzato e nella maggior parte dei casi si verifica entro i primi 2 anni dalla diagnosi iniziale.

Secondo le linee guida della Società Europea di Oncologia Medica, il follow-up clinico dovrebbe essere effettuato ogni 2-3 mesi nei primi due anni dopo il trattamento, ogni 6 mesi nei successivi 3-5 anni e infine una volta all'anno. Per le forme localmente avanzate si consiglia l'imaging del

distretto testa-collo 3 mesi dopo il trattamento per valutare lo stato del paziente. La FDG-PET/TC è raccomandata 3 mesi dopo la chemioterapia nei pazienti N+ per valutare la necessità di una dissezione del collo. La diagnostica per immagini dovrà quindi essere eseguita se il paziente manifesta sintomi o se all'esame obiettivo si riscontrano anomalie. I pazienti trattati con radioterapia vengono sottoposti a controlli odontoiatrici ogni 6 mesi e a dosaggio annuale dell'ormone TSH.^[44]

Secondo uno studio britannico del 2020^[49], il follow-up con tecniche di imaging, come FDG-PET/TC o MRI, è più specifico e sensibile nel riconoscere la recidiva se eseguito ogni 6 mesi anziché ogni 3.

Inoltre, la PET-CT ha sensibilità e specificità più alte rispetto alla MRI per identificare sia la recidiva locoregionale che le metastasi a distanza, sia che venga eseguita a 3 o 6 mesi dopo il trattamento.^[48]

I pazienti che hanno un rischio più elevato di recidiva o di sviluppo di un secondo tumore primario, perché perpetuano l'abitudine al tabacco, hanno un numero di visite di follow-up più elevato rispetto agli altri pazienti e il loro follow-up prosegue dopo i canonici 5 anni.^[40]

Al contrario, per i pazienti che non sono più eleggibili al trattamento curativo, esiste la possibilità di seguire un follow-up meno intensivo, proprio perché questo perde di significato ed è inefficace.^[42]

Il follow-up di questi pazienti può risultare difficile, infatti il persistente disagio orale e la distorsione dei tessuti causata dal trattamento chirurgico e dall'eventuale radioterapia possono nascondere eventuali alterazioni neoplastiche precoci.

Un'altra limitazione dei programmi di follow-up è la variabilità con cui la recidiva può presentarsi, a volte in uno stadio potenzialmente curabile, mentre altre volte ha un comportamento più aggressivo rispetto al tumore primario.^[45]

Il mancato miglioramento della durata di sopravvivenza potrebbe essere correlato a un'inadeguata stratificazione dei pazienti che se eseguita correttamente avrebbe potuto

identificare i soggetti ad alto rischio che avrebbero potuto beneficiare dei programmi di sorveglianza in termini di prognosi migliore. Anche la stratificazione dei pazienti con edizioni precedenti del TNM può essere problematica, perché alcuni fattori prognostici, come DOI ed ENE, non vengono presi in considerazione.^[51]

Da qui la necessità di trovare nuovi metodi non invasivi per individuare precocemente eventuali recidive, compreso il campionamento mediante brushing orale delle cellule orali e la loro analisi genetica.^[50]

La caratterizzazione molecolare del tumore può essere uno strumento per stratificare i pazienti migliorando la determinazione della loro prognosi e del tipo di trattamento più appropriato da seguire.^[11] Anche la ricerca di biomarcatori nella saliva è un metodo non invasivo. La saliva è un fluido biologico prodotto da ghiandole salivari^[52], contenente al suo interno numerose proteine, acidi nucleici, inclusi mRNA e microRNA, metaboliti e microrganismi residenti nella cavità orale, nonché fluidi crevicolari gengivali, detriti alimentari e cellule epiteliali desquamate. I biomarcatori sono molecole presenti in più tessuti e fluidi biologici inclusi sangue, plasma, siero, saliva, urina e feci. Questi biomarcatori sono utili per monitorare lo stato della malattia, rilevare potenziali recidive dopo trattamento chirurgico, radio o chemioterapico e valutare la risposta al trattamento, nonché nello screening di malattie tumorali ancora sconosciute e nella distinzione dei tumori benigni da quelli maligni.^[54]

In termini prognostici il cancro della regione testa-collo è un tumore estremamente eterogeneo, anche in pazienti con stadiazione TNM simile. Per stratificare il rischio vi è una crescente enfasi sull'identificazione di marcatori molecolari che riflettono le caratteristiche biologiche del tumore, in contrapposizione ai parametri classici, tra cui lo stadio TNM e l'invasione vascolare. Le “firme genetiche” sono oggi ampiamente utilizzate anche nella pratica clinica per altri tumori, come quello della mammella e del colon.^[55]

2. MATERIALI E METODI

2.0 Proposta di studio

Questo studio mira a sviluppare un approccio diagnostico centrato sul paziente volto a predire la prognosi in termini di mortalità e rischio di recidiva. Pertanto, intendiamo sviluppare un paradigma multi-parametrico che integri dati clinici, genetici, epigenetici e radiomici per stratificare il rischio di progressione della malattia identificando biomarcatori specifici in grado di implementare l'attuale sistema di stadiazione TNM in termini di previsione prognostica (esito del singolo paziente) e prevedibilità dell'esito del trattamento chirurgico, radioterapico e/o chemioterapico.

Sulla base del bagaglio culturale derivante dagli studi e dai progetti europei già portati a termine presso l'U.O di Chirurgia Maxillo-Facciale di Parma, intendiamo intraprendere un nuovo percorso di ricerca basato sulle alterazioni molecolari che accompagnano l'insorgenza e la progressione dei tumori squamocellulari testa-collo usando la metodica del "brushing" del cavo orale. Si tratta in altre parole, del prelievo di cellule di esfoliazione dalla mucosa del cavo orale, che verrà effettuato sia nel preoperatorio, che durante le visite di follow-up oncologico. Questo consentirà la valutazione delle alterazioni genomiche presenti nelle cellule tumorali che potrebbero rivelarsi come candidabili per essere identificati come biomarcatori prognostici in grado di predire la risposta al trattamento e la possibile recidiva.

Inoltre, per integrare l'analisi della biopsia liquida, verranno prelevati campioni di saliva che saranno poi sottoposti ad analisi molecolare e genomica.

2.1 Centri coinvolti

Lo studio coinvolge centri di comprovata esperienza nei rispettivi settori. Il centro promotore sarà l'UO di Chirurgia Maxillo Facciale (Centro 1). Gli altri centri collaboranti saranno:

- Centro 2: Dipartimento di Scienze Matematiche, Fisiche e Informatiche, Università di Parma.

- Centro3: UO di Genetica Medica, Dipartimento Diagnostico, AOU di Parma.
- Centro 4: UO di Scienze Radiologiche, Dipartimento Diagnostico, AOU di Parma.
- Centro 5. Laboratorio di Biochimica, biologia molecolare ed oncometabolismo, Università di Parma.
- Centro 6: UO di Anatomia Patologica, Dipartimento Diagnostico, AOU di Parma.

2.2 Obiettivi dello studio

Obiettivi primari:

- Sviluppare strumenti e metodi per l'analisi dei dati sfruttando software AI di intelligenza artificiale.
- Convalidare un modello prognostico multiparametrico per pazienti con SCC di stadio I, II, III e IV della testa e del collo.

Obiettivi secondari:

- Valutare il possibile impatto del nuovo sistema prognostico sulla scelta del trattamento e del follow-up da parte del medico
- Valutare la reale predittività della recidiva del cancro orale mediante il metodo dello spazzolamento e il campionamento della saliva.

2.3 Finanziamenti e coperture assicurative

Lo studio è finanziato in parte dal programma PHAST “Photonics for Healthcare: multiscale cancer diagnosis and Therapy”, progetto europeo che mira all’impiego della biofotonica per la diagnosi dei tumori. Capofila del progetto è l’Università di Parma (con il Dipartimento di Ingegneria e Architettura), che guida una partnership di 22 realtà (tra le quali anche due ospedali e otto aziende) di 7 paesi europei. Coordinatore scientifico è Daniel Milanese, docente di Scienza e Tecnologia dei Materiali all’Università di Parma. Il progetto durerà quattro anni, nell’ambito delle iniziative Marie Skłodowska-Curie Innovative Training Networks di Horizon 2020. Il

destinatario istituzionale di tale finanziamento è l'Università di Parma. Tale finanziamento coprirà tutti i costi dello studio.

Non è prevista alcuna copertura assicurativa specifica. In particolare, è previsto che l'U.O. di Chirurgia Maxillo Facciale dell'AOU di Parma adotti la usuale copertura assicurativa di base per le attività sanitarie.

2.4 Disegno dello studio

Lo studio è prospettico, con arruolamento monocentrico. Il presente studio, non-profit, non modifica in alcuno modo l'iter diagnostico e terapeutico dei pazienti reclutati, che sarà conforme alle best practices in uso presso l'UO di Chirurgia Maxillo Facciale di Parma, e prevede la collaborazione fra i Centri precedentemente descritti per la raccolta e l'analisi dei dati.

Verranno messi a punto strumenti e metodi per l'analisi dei dati sfruttando software di intelligenza artificiale (IA). Verrà garantito l'accumulo e lo storage in sicurezza dei dati, sul cluster HPC di Parma. Nella fase di preprocessing, si effettuerà pulizia ed elaborazione dei dati in modo da poter essere forniti come input per il training di modelli di IA. In particolare saranno esplorati e preliminarmente testati modelli basati su Decision Tree, Random Forests e Neural Networks.

Verranno raccolti molteplici dati anamnestici, clinici, patologici e istologici per affinare i nuovi modelli prognostici, insieme a dati genomici e radiomici. L'outcome verrà valutato esaminando la presenza di recidiva o morte a 24 mesi, esaminando i dati sulla sopravvivenza globale a 3 e 5 anni e i dati sulla qualità della vita. Si valuteranno le anomalie geniche dei singoli pazienti e i dati verranno incrociati al fine di stabilire delle correlazioni simili.

I dati anagrafici, la storia medica dei pazienti, le comorbidità, lo stadio TNM, il grading, i dati radiomici e genomici, il tipo di intervento subito, la sopravvivenza libera da malattia e la sopravvivenza globale, saranno costantemente aggiornati. Le analisi avranno come obiettivo l'utilizzo dei modelli di IA per ottenere una stratificazione dei pazienti che possa implementare quella fornita dai protocolli TNM.

2.5 Popolazione dello studio

I soggetti reclutati saranno pazienti affetti da HNSSC operati presso la UO di Maxillo Facciale di Parma. Verificati i criteri di inclusione, saranno fornite le informative ai pazienti, incluse quelle

per il trattamento dei loro dati personali e genetici, e sarà raccolto il consenso alla partecipazione allo studio.

Il numero totale di pazienti che saranno analizzati è 75. Il Centro 1 arruolerà i pazienti acquisendo i consensi alla raccolta e analisi dei dati, l'autorizzazione al trattamento dei dati personali, e si assumerà la responsabilità della privacy relativa, predisponendo anche la griglia di pseudoanonimizzazione dei pazienti e sua conservazione.

2.5.1 Criteri di inclusione ed esclusione

Criteri di inclusione:

- Acquisizione del consenso informato del soggetto (o del legale rappresentante se applicabile) alla partecipazione allo studio e all'utilizzo dei dati personali;
- Diagnosi primaria confermata istologicamente di carcinoma a cellule squamose del cavo orale, orofaringe;
- Stadio clinico I II III IV;
- Paziente candidato al trattamento curativo: $\pm$ chirurgia $\pm$ radioterapia $\pm$ chemioterapia;
- Età $\geq$ 18 anni.

Criteri di esclusione:

- Qualsiasi precedente tumore della regione della testa e del collo;
- Pazienti con precedenti tumori maligni negli ultimi 5 anni prima del trattamento per cancro della testa e del collo, ad eccezione del carcinoma in situ della cervice trattato chirurgicamente, cancro al seno in situ, riscontro accidentale di cancro alla prostata in stadio T1a o T1b e cellule basali o cellule squamose carcinoma della pelle;
- Qualsiasi precedente neoplasia trattata chirurgicamente e/o mediante radioterapia della regione della testa e del collo;
- Tipo istologico diverso dal carcinoma a cellule squamose della testa e del collo (esclusi cancro del rinofaringe, delle ghiandole salivari e del seno).

2.5.2 Ruolo dei centri partecipanti e flusso delle attività

- Centro 1 - UO di Chirurgia Maxillo-Facciale, Dipartimento Testa-Collo, AOU di Parma. Coordinerà lo studio, recluterà i pazienti, raccoglierà i dati anagrafici, clinici, istologici, radiomici e genomici già inseriti nei database del progetto BD2Decide, completerà e aggiornerà le suddette informazioni ove necessario, rispettando gli standard GDPR secondo le linee guida indicate da DPO. Eseguirà il brushing del cavo orale e il sampling salivare sia preoperatoriamente che durante il follow up.
- Centro 2: Dipartimento di scienze matematiche, fisiche ed informatiche, Università di Parma. Effettuerà le analisi dei dati sfruttando metodologie di machine learning (ML) e di intelligenza artificiale (IA), garantirà lo storage in sicurezza dei dati pseudoanonimizzati sul cluster HPC di Parma.
- Centro 3: UO di Genetica Medica, Dipartimento Diagnostico, AOU di Parma. Condurrà le analisi genetiche.
- Centro 4: UO Scienze radiologiche, Dipartimento Diagnostico, AOU di Parma. Integrerà con le immagini radiologiche le informazioni cliniche e genetiche.
- Centro 5: Unità di laboratorio di Biochimica, biologia molecolare ed oncometabolica. Condurrà analisi high throughput (RNA-Seq) per valutare l'espressione differenziale di RNA lunghi (mRNA e lncRNA) e corti (miRNA) nei pazienti arruolati. Le determinazioni saranno eseguite, in parallelo su brushing e campioni di saliva prelevati dallo stesso, paziente, al fine di identificare possibili biomarcatori diagnostici/prognostici e valutare la concordanza dei dati ottenuti attraverso i due diversi metodi di prelievo non invasivo.
- Centro 6: UO di Anatomia Patologica, Dipartimento Diagnostico, AOU di Parma.

2.6 Raccolta dei campioni

La raccolta del campione di saliva e lo spazzolamento orale saranno eseguiti dal Centro promotore.

Raccolta di campioni salivari.

Ogni campione raccolto dovrà contenere un numero identificativo legato al paziente, data e ora del prelievo. Dovrebbero essere specificati anche il sesso, l'età e la diagnosi iniziale del paziente. Verrà inoltre indicato se si tratta di un prelievo salivare eseguito prima dell'intervento o nel follow-up.

Di seguito la procedura da noi adottata per la raccolta del campione di saliva:

- Il paziente non deve mangiare nelle due ore precedenti il prelievo; si eviterà anche il consumo di alcol e il fumo di sigaretta/tabacco;
- Il paziente non deve deglutire la saliva in modo da trattenerla nel cavo orale per almeno 3 minuti;
- Il paziente deve sputare la propria saliva all'interno di un contenitore sterile con tappo;
- Il contenitore va posto in frigorifero a -5°C e va trasportato in laboratorio nelle prime ore successive al prelievo;
- Una volta in laboratorio, il contenitore contenente la saliva deve essere processato immediatamente oppure può essere conservato in frigorifero a -90° per 30 giorni.

Esecuzione del Brushing

La metodica prevede l'utilizzo di uno spazzolino comunemente utilizzato nella pratica clinica per l'igiene del cavo orale del paziente. Il prelievo verrà sempre effettuato prima dell'anestesia e della seguente biopsia incisionale. Il pennello viene posto e lasciato all'interno di una provetta conica da 15 ml contenente 1,5 ml di tampone fosfato.

2.6.1 Flusso di dati

I dati saranno generati dal Centro 1 (pregresso database e aggiornamento dei dati clinici) e dal Centro 5 e Centro 6 (nuovi dati genomici estratti dai campioni istologici prelevati al momento dell'intervento e dati trascrittomici estratti da brushing e raccolta salivare). Il Centro 3 elaborerà i dati genetici mentre il centro 4 i dati radiomici.

Ciascuna UO garantirà la conservazione dei dati pseudoanonimizzati in accordo con quanto previsto dalle GCP. Il Centro 2 riceverà i dati ed effettuerà elaborazioni e analisi statistiche previste per i rispettivi set di dati.

Il database già adottato nel progetto BD2Decide (progetto internazionale promosso dalla comunità europea già vagliato dal comitato etico locale) sarà utilizzato come guida per l'inserimento dei nuovi dati clinici aggiornati e i nuovi dati genomici. I dati saranno utilizzati per realizzare e perfezionare modelli prognostici personalizzati multiparametrici basati su tecnologia AI.

Un'innovazione del progetto è l'applicazione della metodologia "stepwise" nei nostri modelli, che permette di misurare il reale valore aggiunto di ogni fattore prognostico. Infine si utilizzano anche i dati relativi alla popolazione per contestualizzare ogni paziente nel suo gruppo etnico, socioeconomico e sanitario di riferimento.

2.6.2 Analisi genetica

L'attività dell'U.O. di Genetica Medica, coerentemente con il ruolo della disciplina in ambito clinico, sarà quello di valutare l'eventuale presenza di predisposizioni costituzionali allo sviluppo di neoplasie del cavo orale. La presenza di tale predisposizione può essere sospettata nel caso in cui si riscontrino nell'analisi genomica somatica dei campioni analizzati, varianti in geni/malattia (es. TP53), le cui mutazioni costituzionali potrebbero essere alla base dello sviluppo della neoplasia. Le analisi di verifica verranno eseguite mediante sequenziamento del DNA estratto dai linfomonociti del sangue della variante riscontrata con frequenza allelica $> 30\%$ nel tessuto neoplastico, previa consulenza genetica e firma di specifico consenso. Anche in questo contesto avverrà la restituzione del referto e l'eventuale estensione dell'indagine ai familiari, come da prassi clinica.

2.6.3 Analisi Trascrittomica

Al laboratorio di Biochimica, Biologia Molecolare e Oncometabolismo (Centro 5) giungeranno i campioni di saliva e di spazzolamento raccolti dal Centro 1. I campioni verranno processati immediatamente per ridurre al minimo il rischio di degradazione dell'RNA.

Lo spazzolino con cui è stato eseguito il brushing con cui è stato raccolto il campione viene suddiviso in una provetta priva di DNasi e RNasi contenente 2 mL di terreno RPMI, che viene immediatamente congelata (-20°C). Successivamente, i campioni vengono scongelati, la spazzola rimossa e il pellet cellulare viene isolato mediante centrifugazione. Il surnatante viene scartato e l'RNA totale viene estratto dal pellet utilizzando un kit commerciale di colonne di gel di silice (miRNeasy microkit, Qiagen) includendo una fase di eliminazione della contaminazione del DNA genomico mediante digestione con DNAasi. Per i campioni di saliva, eventuali cellule e detriti vengono separati mediante centrifugazione a 2600 g per 15 minuti a 4°C. Vengono prelevati 500 µl di supernatante e utilizzati per estrarre direttamente l'RNA utilizzando lo stesso kit utilizzato per la spazzolatura. La quantificazione e il controllo dell'integrità dell'RNA ottenuto vengono eseguiti mediante un metodo fluorimetrico altamente sensibile (limite di rilevamento inferiore a 5 ng di RNA) e utilizzando un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

Il sequenziamento dell'RNA mediante tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS) è un metodo altamente sensibile e accurato per condurre analisi dell'espressione genica. RNA-seq consente l'identificazione e le variazioni nell'analisi delle trascrizioni codificanti e non codificanti che non si limitano a quelle annotate su un genoma di riferimento. Anche mediante sequenziamento "untargeted" è possibile ottenere informazioni sulla fine architettura del trascrittoma (fusioni, mutazioni, varianti di trascritto, mutazioni di sequenza ecc.) in un unico esperimento. Inoltre, a differenza delle classiche analisi di "gene profiling" condotte esclusivamente su cDNA codificanti proteine, è possibile ottenere informazioni su un gran numero di RNA non codificanti che svolgono un ruolo molto importante nella regolazione dell'espressione genica (es. -RNA codificante, lncRNA e micro-RNA, miRNA).

A seconda della quantità di RNA ottenuto, verranno generate due diverse librerie di cDNA per ciascun campione, una ottimizzata per l'arricchimento di sequenze di RNA lunghe (mRNA e lncRNA) e una ottimizzata per massimizzare le informazioni sugli RNA corti (miRNA e piRNA).

Qualora il recupero dell'RNA fosse inferiore a 100 ng, verrà data priorità alla costruzione della sola libreria per il sequenziamento dei miRNA. In entrambi i casi, verranno impiegati metodi di deplezione dell'RNA ribosomiale che consentono di trattenere nel campione per il sequenziamento gli RNA privi di code poliA. Il sequenziamento verrà eseguito su piattaforma Illumina (Next Seq 500 disponibile presso il Corelab dell'AUO Parma), i dati acquisiti verranno allineati utilizzando piattaforme di cloud computing e verranno stimati i cambiamenti nell'espressione dell'RNA. I dati trascrittomici verranno utilizzati per l'analisi multiparametrica condotta dal Centro 2 e aiuteranno a identificare biomarcatori prognostici per la stratificazione del rischio di recidiva e una migliore gestione del follow-up dei pazienti HNC a diversi stadi. La validazione di mRNA, lncRNA e miRNA differenzialmente espressi identificati da RNASeq sarà eseguita mediante RT-Real Time PCR (qPCR). In breve, per valutare l'espressione dell'mRNA e dell'lncRNA, l'RNA verrà retrotrascritto utilizzando primer casuali (per consentire la retrotrascrizione degli RNA privi di code poli-A). Il cDNA ottenuto verrà poi amplificato mediante qPCR, utilizzando sonde commerciali Master-Mix e Taq-Man o Syber-Green. Per i miRNA, la retrotrascrizione e l'amplificazione saranno condotte mediante saggi di sintesi e amplificazione del cDNA di miRNA TaqMan Advanced.

2.6.4 Analisi radiomica

Al radiologo viene chiesto di selezionare e contrassegnare un sottoinsieme di sezioni di immagini chiave che mostrano chiaramente la massa tumorale e i linfonodi associati, se presenti. Queste immagini dovrebbero essere disponibili per la consultazione online da parte di tutti i medici coinvolti e autorizzati.

Durante la fase di segmentazione, la qualità dell'immagine sarà valutata soggettivamente dal radiologo in base ai seguenti criteri:

- contrasto intrinseco della(e) massa(i) tumorale(i);
- contrasto intrinseco del tessuto infiltrato rispetto al tessuto sano;
- assorbimento del mezzo di contrasto.

Tutte le caratteristiche di cui sopra dovrebbero essere soddisfacenti in termini di qualità. Le immagini di bassa qualità dovrebbero essere ripetute. Se si sospetta un'infiltrazione tissutale, il radiologo dovrà indicarlo chiaramente nell'invio dell'immagine e segnalarlo come parte delle osservazioni sulla registrazione dell'immagine nella cartella clinica elettronica già adottate nel protocollo di BD2Decide.

La qualità dell'immagine può essere valutata ex-post confrontando la stadiazione TNM dello strumento di analisi delle immagini BD2Decide con l'effettiva stadiazione pTNM. Devono essere soddisfatti i seguenti requisiti minimi relativi all'acquisizione di immagini diagnostiche. Il processo di registrazione delle immagini richiede che la testa si trovi in una posizione simile per tutte le immagini.

Tutte le immagini devono essere rese anonime prima di essere caricate nello strumento di analisi delle immagini. Tutti i tag DICOM che consentono l'identificazione del paziente devono essere rimossi.

Per l'imaging RM, i requisiti strutturali sono i seguenti:

- imaging RM ad alto campo: 1,5 Tesla o più;
- bobina per il collo;
- postazione di lavoro per la valutazione dei dati;
- possibilità di esportare dati DICOM su CD o file per trasferirli in un database;
- Possibilità di estrarre e scaricare riferimenti in formato elettronico (file txt, pdf).

Requisiti di qualità dell'immagine:

- l'intero tumore e i relativi linfonodi devono essere visibili in tutte le sequenze MRI.

- il movimento e gli artefatti metallici nel piano del cancro possono essere accettati nella misura in cui viene mantenuta la qualità diagnostica;
- Buon miglioramento del contrasto. Nello specifico, l'ideale sarebbe un protocollo standard per l'iniezione del mezzo di contrasto: concentrazione di gadolinio 0,5 mmol/ml, quantità di mezzo di contrasto 0,2 ml/kg, velocità di iniezione 1,5 ml/sec, l'acquisizione MR inizia al termine dell'iniezione.

2.6.5 Radiomica

La radiomica è un campo emergente della diagnostica per immagini che estrae e analizza molte caratteristiche quantitative dalle immagini diagnostiche al fine di distinguere le differenze fenotipiche nei tumori e migliorare il potere prognostico dell'immagine. L'estrattore di caratteristiche radiomiche (RFE) valuterà quattro classi di caratteristiche dell'immagine che descrivono le caratteristiche del tumore: I) intensità, II) forma, III) struttura e IV) caratteristiche multiscale o multilivello. Le caratteristiche basate sull'intensità del tumore includono statistiche del primo ordine calcolate dall'istogramma di tutti i valori di intensità del voxel tumorale, ovvero media, mediana, deviazione standard, intervallo, minimo, massimo, curtosi, asimmetria, energia, entropia. Le caratteristiche basate sulla forma descrivono la forma e le dimensioni del tumore, ad esempio sfericità, compattezza, diametro 3D massimo, area superficiale e volume del tumore. Le caratteristiche strutturali considerano la posizione relativa dei vari livelli di grigio sull'immagine, descrivendo così i modelli o la distribuzione spaziale delle intensità dei voxel, che sono stati calcolati, ad esempio, dalla co-occorrenza dei livelli di grigio e dalle matrici della lunghezza delle serie dei livelli di grigio o delle dimensioni della zona grigia, rispettivamente. Includono, ad esempio, autocorrelazione, risalto del cluster, ombra del cluster, contrasto, dissomiglianza, omogeneità, non uniformità del livello di grigio, non uniformità della lunghezza della sequenza, percentuale della sequenza, enfasi su piccola area, percentuale dell'area, enfasi ad alta intensità.

Analisi multiscala o multilivello: l'analisi di Fourier o Wavelet fornisce caratteristiche di intensità e tessiturali, ad esempio, a diverse scale e derivate. Verranno valutate la stabilità delle caratteristiche in un test-retest (ovvero la ripetibilità) e un contesto inter-osservatore. Immagini di base ripetute (ad esempio, con un intervallo di 15 minuti) verranno utilizzate per valutare l'affidabilità test-retest delle caratteristiche. La stabilità delle caratteristiche radiomiche alla variazione delle delineazioni manuali sarà valutata utilizzando lesioni delineate da diversi oncologi.

2.6.6 Analisi statistiche

I dati pseudo anonimizzati verranno analizzati dal Centro 2 utilizzando algoritmi per l'apprendimento supervisionato e non supervisionato.

Nello specifico, verranno utilizzate metodologie di machine learning supervisionate (ovvero classificazione e regressione) per identificare tumori con caratteristiche suggestive di aumentata aggressività loco-regionale e/o resistenza alla radioterapia e per la valutazione del rischio in termini di mortalità e recidiva. Per fare ciò, i modelli classici di machine learning supervisionato saranno arricchiti con misure provenienti dall'analisi di sopravvivenza, il cui scopo è studiare la mortalità/sopravvivenza al variare del tempo. Il modello di machine learning supervisionato (ovvero clustering e riduzione della dimensionalità) sarà impiegato in due diverse applicazioni: I) stratificazione dei pazienti e, quindi, di tumori specifici; II) confrontare modelli prognostici alternativi e valutare il valore aggiunto rispetto al sistema di stadiazione TNM. Inoltre, verranno valutati modelli di intelligenza artificiale, come la rete neurale profonda, per combinare dati anamnestici, clinici, patologici, istologici e omici e affinare i nuovi modelli prognostici.

I dati raccolti sono stati estratti dalle cartelle cartacee dei pazienti seguiti dall'Unità Operativa di Chirurgia Maxillo Facciale di Parma; le informazioni raccolte comprendono il referto istopatologico, la cartella clinica chirurgica e la relazione del percorso diagnostico terapeutico assistenziale (PDTA) del paziente.

2.7 “Modified TRIzol lysis protocol”: Metodo modificato di estrazione cloroformio-fenolo secondo Vaibhav Gandhi.

Secondo l’Istituto Nazionale di Sanità, un biomarcatore è un indicatore oggettivamente misurato di normali processi biologici, patogeni e risposte farmacologiche all’intervento terapeutico.^[60] In sintesi, i biomarcatori sono entità all’interno del corpo in grado di fornire informazioni imparziali riguardanti l’attuale stato fisiologico di un organismo vivente.^[61]

La saliva è stata recentemente identificata come una potenziale fonte di biomarcatori a fini diagnostici.^[63] Uno dei principali vantaggi della saliva è la raccolta non invasiva dei campioni. Il campionamento è rapido e semplice da eseguire il che lo rende vantaggioso per lo screening su larga scala di bambini, anziani o nei casi in cui siano richiesti campioni ripetuti.^[62] Tutti questi vantaggi hanno indotto i ricercatori ad ampliare le loro conoscenze su questo metodo di screening relativamente nuovo. La saliva è un fluido complesso, contenente una varietà di enzimi, ormoni, anticorpi costituenti antimicrobici e fattori di crescita. Molti di questi componenti entrano nella saliva attraverso la via transcellulare (diffusione intracellulare passiva e trasporto attivo) o paracellulare (ultrafiltrazione extracellulare).^{[64][65][66]} La maggior parte dei composti presenti nel sangue sono presenti anche nella saliva e pertanto la saliva è funzionalmente equivalente al siero nel riflettere lo stato del corpo, comprese variazioni ormonali, nutrizionali e metaboliche.^[67]

La proteomica sulla saliva ha identificato oltre un migliaio di proteine salivari prodotte dalle principali ghiandole salivari.^[68] Tuttavia, gli studi di trascrittomiche salivare rappresentano un territorio nuovo nella diagnostica. In questi studi, la sovraregolazione o la sottoregolazione di vari geni trascritti possono servire come indicatori di biomarcatori di particolari malattie o condizioni. Sono disponibili vari metodi per estrarre RNA dalla saliva, ad esempio metodi che utilizzano fenolo e isotiocianato di guanidinio, colonne rotanti con membrana di silice o kit di isolamento dell’RNA basati su sfere magnetiche^[69]. Tuttavia a causa della natura complessa della saliva come fluido corporeo, ci sono molti contaminanti come proteine, molecole organiche

complesse e batteri. Inoltre, gli enzimi presenti nella saliva rendono anche l'RNA naturalmente incline alla degradazione. Tutti questi fattori influenzano la qualità dell'RNA estratto con vari metodi. A valle, la qualità dell'RNA è importante per la sensibilità e specificità dell'esperimento. Per l'analisi dell'espressione genica misurata mediante reazione a catena della polimerasi quantitativa q(PCR) o mediante sequenziamento dell'RNA, il limite inferiore accettabile per la qualità dell'RNA(RQI)< 7.0.^[70] Pertanto, è fondamentale superare questo livello minimo di qualità soglia per mantenere l'integrità sperimentale degli studi sull'espressione genica. L'obiettivo principale di questo studio è di sviluppare un protocollo robusto, affidabile e riproducibile per estrarre elevate quantità di RNA di qualità dalla saliva umana intera. Utilizzando l'RNA estratto dal nostro protocollo TRIzol (Thermo Fisher Scientific) abbiamo convalidato la specificità della tecnica qPCR di trascrizione inversa per ciascun set di primer eseguendo una curva di fusione e confermando un singolo picco.

2.7.1 Partecipanti

Al momento della stesura di questo elaborato sono stati arruolati 20 pazienti trattati per carcinoma del cavo orale tra Maggio 2023 e Dicembre 2023 presso l'U.O di Chirurgia Maxillo-Facciale di Parma. Tutti i pazienti presentavano i criteri di inclusione previsti dal protocollo. Allo stato attuale le analisi sulla raccolta salivare e sul cellule esfoliative raccolte dal brushing sono state eseguite su 14 pazienti.

N	Data di nascita	Sesso	Sede Neoplasia	Laterale	Fumo	Alcol	Dieta	ASA	Hb	Piastrine	Farmaci
1	20/04/1952	M	Guancia	Sx	No	No	Varia	III	11.4	171	nessuno
2	16/04/1964	F	Lingua	Dx	ex	No	Varia	II	13.3	243	sereupin
3	19/09/1950	F	Trigono	Sx	ex	No	Varia	III	13.9	234	metformina,jardiance,olmesartan,amlodipina
4	02/10/1939	M	Trigono	Dx	No	No	Varia	I	15.0	227	Forzaar,crestor,cardioasa,omnic
5	16/03/1968	F	Lingua	Dx	Si	Si	Varia	I	13.7	244	tritto,depakin,ciprale, diazepam
6	29/11/1965	M	Mascella re	Dx	ex	No	Varia	I	14.5	132	diazepam
7	22/04/1956	F	Trigono	Sx	No	Occasionale	Varia	II	13.9	279	Colestab
8	19/02/1956	M	mandibola	Sx	ex	No	Varia	II	13.2	229	nessuno
9	02/07/1940	M	mandibola	Sx	ex	No	Varia	II	12.8	225	cardioasa,tareg
10	11/05/1950	F	lingua	Dx	no	no	Varia	II	14.0	189	atorvastatina
11	25/12/1956	M	guancia	Sx	ex	Occasionale	Varia	II	14.9	222	torvast,asa,nebivololo,alfuzosina
12	08/02/1953	M	vestibolo	Sx	ex	No	Varia	III	12.5	79	bisoprololo,ramipril,ezetimibe,lecanidipina,asa
13	13/08/1953	F	trigono	Sx	ex	Occasionale	Varia	II	14.3	241	torvast,lexotan
14	06/10/1962	F	lingua	Sx	No	No	Varia	II	13.2	248	lotada
15	11/10/1941	F	tuber	dx	No	No	Varia	II	12.6	185	lercadip,stiliden,pregabalin,lendor min
16	13/01/1937	F	mandibola	sx	No	No	Varia	I	12.7	222	asa,lasix,bisoprololo,torvast,zolof, lansox,macula
17	10/03/1962	M	palato		Si	No	Varia	I	12.7	314	metformina
18	01/11/1935	M	mandibola	dx	no	no	Varia	III	13.2	201	eliquis,amiodarone,lecanidipina,d oxasosina,
19	19/07/1962	M	lingua	sx	No	No	Varia	I	13.2	299	No
20	09/10/1949	F	lingua	sx	No	No	Varia	III	12.1	281	Eutirox, Cardicor, ASA

N	Comorbidità	Pregresse neoplasie	Risonanza	TC torace addome	PET	Stadio clinico
1	nessuna	No	19/04/2023	26/04/2023	No	cT2N2bM0
2	nessuna	No	01/04/2023	07/04/2023	No	cT1N0M0
3	diabete-cardiopatia ipertensiva,ipotiroidismo	No	10/05/2023	03/05/2023	No	cT4aN2cM0
4	ipertensione,IPB	No	25/03/2023	17/04/2023	No	cT1N0M0
5	disturbo bipolare,ipertensione	No	17/05/2023	10/05/2023	No	cT2N2M0
6	ansia	No	24/05/2023	22/05/2023	No	cT4aN2bM0
7	Ipercolesterolemia	No	26/04/2023	15/05/2023	No	cT1N0M0
8	nessuna	No	14/06/2023	09/06/2023	No	cT2N2bM0
9	Ipertensione-Ipercolesterolemia	No	16/06/2023	15/06/2023	No	cT4aN0M0
10	ipercolesterolemia,artrosi	Polipo intestinale 1998	14/06/2023	12/06/2023	No	cT3N1M0
11	ectasia aortica,ipercolesterolemia	No	14/07/2023	11/07/2023	No	cT2N1M0
12	stent cardiaco,iperuricemia	No	13/06/2023	22/06/2023	No	cT4aN0Mx

13	nessuna	No	20/07/2023	17/07/2023	No	cT1N0M0
14	fibromialgia-glaucoma	Oncocitoma renale	02/08/2023	08/08/2023	No	cT3N0Mx
15	epatite B, ipertensione, varici AAIL, depressione	No	30/08/2023	22/08/2023	No	cT2N0M0
16	s.depressiva, cardiopatia ischemica, ipercolesterolemia	No	23/08/2023	21/08/2023	No	cT2N0M0
17	diabete mellito	No	06/09/2023	08/09/2023	No	cT2N1M0
18	FA, ipoacusia, embolia polmonare, pregresso IMA	No	No	08/09/2023	No	cT2N0M0
19	No	No	29/11/2023	24/11/2023	No	cT2N1M0
20	Sarcoidosi, ipertensione, Deficit mnemonico	No	15/11/2023	15/12/2023	No	cT4aN3bM0

N	Intervento	SLC	Lembo	Stadio Patologico	Radioterapia	Chemioterapia	Immunoterapia
1	Asportazione	I-IV	Forearm	pT4aN0Mx	Si	No	No
2	Glossectomia + Integra	I-III	No	PT2N0Mx	No	No	No
3	Mandibulectomia	I-IV bil	Fibula	pT4aN3bMx	No	No	No
4	Asportazione + Sentinella	No	No	pT1N1M0	No	No	No
5	Glossectomia	I-V	Gran dorsale	pT2N3bM0	Si	Si	No
6	Maxillectomia-scalino mandibolare	I-IV	Fibula	pT4aN3bMx	Si	Si	No
7	Asportazione	I-III	Famm	pT1N0Mx	No	No	No
8	mandibulectomia sx	I-IV	Fibula	pT4aN0Mx	Si	No	No
9	mandibulectomia sx	I-IV	Scapola	pT4aN0M0	Si	Si	No
10	glossectomia subtotale	I-V dx I-IV sx	Gran dorsale-pettorale	pT4aN3bMx	Si	Si	No
11	asportazione	I-IV	forearm	pT2N2bM0	Si	Si	No
12	asportazione	I-IV	forearm	pT4aN0Mx	Si	No	No
13	asportazione	I-III	fascia temporale	pT3N0M0	Si	no	no
14	glossectomia	I-IV	forearm	pT1N0Mx	No	No	No
15	asportazione	No	Bichat	pT1N0Mx	No	No	No
16	asportazione-scalino osseo	I-III	submentale	pT1N0Mx	No	No	No
17	maxillectomia	I-IV	Fibula	pT4aN0Mo	Si	No	No
18	asportazione-scalino osseo	I-III	No	pT4aN2bM0	No	No	No
19	glossectomia	I-III	Forearm	pT3N1M0	Si	No	No
20	glossectomia subtotale	I-IV bil	Gran dorsale	pT3N3bM0	Si	No	No

Tabella 2.1 Popolazione dello studio

2.7.2 Raccolta campioni salivari

A tutti i soggetti dello studio è stato chiesto di non mangiare né bere per almeno 2 ore prima della raccolta del campione. La saliva intera non stimolata è stata raccolta in provette sterili prive di DNasi e RNasi da 50 ml (Thermo Fisher Scientific) mediante metodo della sbavatura passiva.^[105] Immediatamente dopo la procedura di raccolta tutti i campioni sono stati congelati in ghiaccio secco fino a 2 ore prima della preparazione.

2.7.3 Brushing

Il metodo prevede l'utilizzo di uno spazzolino comunemente utilizzato nella pratica clinica per l'igiene orale dei pazienti. La spazzolatura verrà sempre effettuata prima dell'intervento chirurgico. Lo spazzolino viene strofinato a livello della lesione orale. Viene poi riposto e lasciato all'interno di una provetta conica da 15 ml contenente 1,5 ml di tampone fosfato.

2.7.4 Protocollo di estrazione dell'RNA

Tutte le procedure sono state eseguite in ambiente privo di RNasi e i campioni sono stati assegnati per l'isolamento dell'RNA utilizzando il Protocollo TRIzol.

2.7.5 Preelaborazione del campione

I campioni salivari congelati sono stati scongelati a temperatura ambiente. Non abbiamo utilizzato bagnomaria per accelerare lo scongelamento, poiché questo potrebbe degradare l'RNA e comprometterne la qualità. I campioni sono stati divisi in aliquote da 1mL in provette Denville Posi-Click sterili prive di DNasi e RNasi da 1,7 mL e centrifugati a 4000 RCF e 4°C per 20 minuti. Il surnatante salivare non è stato utilizzato per la preparazione dell'RNA, ma è stato conservato a -80°C e utilizzato per l'analisi proteomica e delle citochine.

2.7.6 Protocollo TRIzol Modificato

Un millilitro di reagente TRIzol è stato aggiunto a ciascun pellet e pipettato diverse volte, seguito da vortex per 20 secondi per omogeneizzare il campione. Abbiamo quindi incubato i campioni a temperatura ambiente per cinque minuti. A questo punto sono stati aggiunti 200ul di cloroformio a ciascuna provetta e vortexati per 20 secondi, seguiti da incubazione a temperatura ambiente per 3-5 minuti.

I campioni sono stati quindi centrifugati a 16 100 RCF per 20 minuti a 4 °C. Circa 700 µl dello strato acquoso superiore è stato trasferito con attenzione in una nuova provetta Posi-click da 1,7 ml. Questi passaggi in cloroformio sono stati ripetuti due volte e per ogni volta consecutiva una quantità inferiore, 600 µl nel primo e 500 µl di strato acquoso superiore nella seconda ripetizione è stata trasferita con cura nelle nuove provette. A questo punto, a ciascuna provetta sono stato aggiunti 500 µl di alcol isopropilico freddo e agitati nel vortex per alcuni secondi. Le provette sono state incubate a -20 °C per 60 minuti per assicurare la precipitazione dell'RNA. Dopo l'Incubazione, i campioni sono stati poi centrifugati per 20 minuti ad 1 °C a 16 100 RCF. Il Surnatante è stato rimosso e scartato. Il pellet è stato lavato con 1 mL di etanolo freddo all'80% e centrifugato a 16 100 RCF per 5 minuti ad 1°C, questo passaggio è stato ripetuto 2 volte. I campioni sono stati quindi brevemente centrifugati e l'etanolo in eccesso è stato rimosso utilizzando una pipetta. Il pellet è stato essiccato all'aria a temperatura ambiente per 5 minuti, risospeso in 20 µl di acqua priva di DNasi e RNasi. Infine, i campioni sono stati agitati brevemente nel vortex e abbiamo utilizzato una rotazione rapida per raccogliere i campioni sul fondo della provetta.

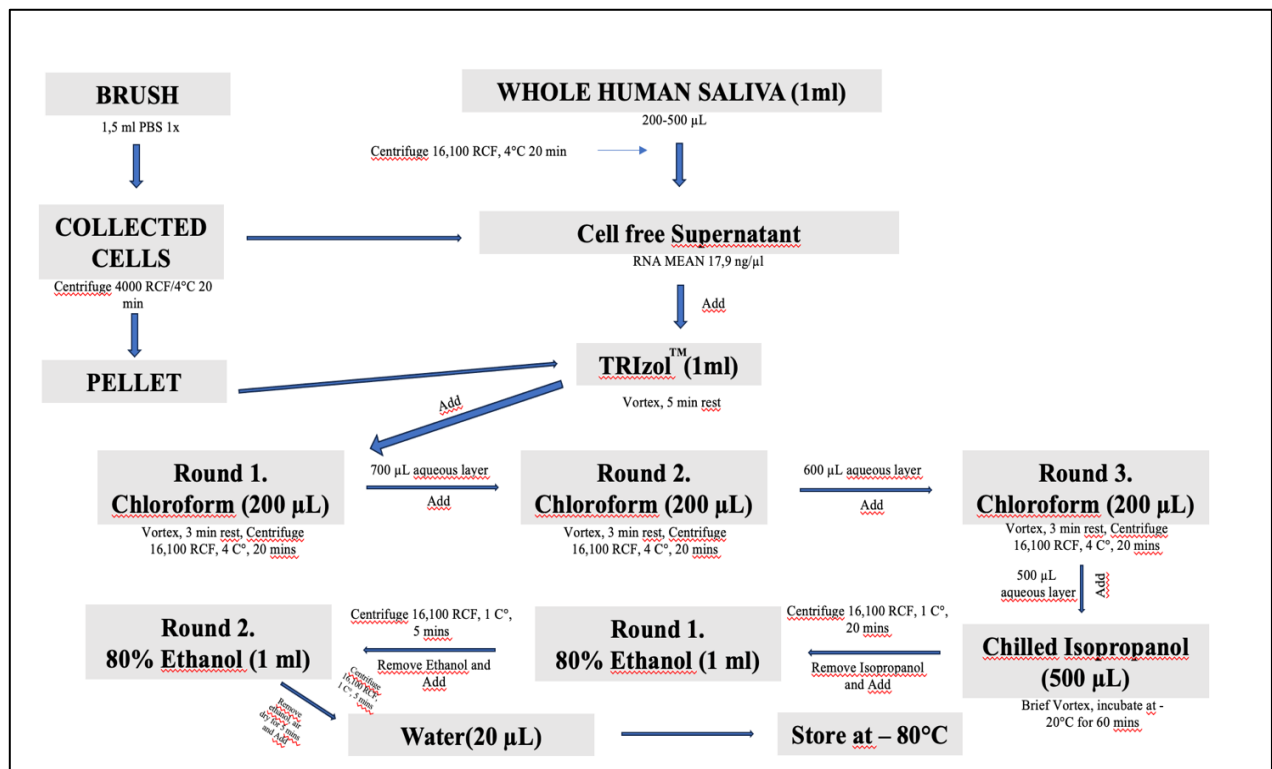


Figura 3.1 Protocollo TriZol Modificato

3. RISULTATI

3.1 Valutazione quantitativa e qualitativa

Per quantificare l'RNA abbiamo utilizzato Nanodrop 2000 spectrophotometer.

3.2 RNA quantity

Secondo i dati Nanodrop, la concentrazione media di RNA nei campioni di TRIzol modificato è stata di 17,9 ng/ μ l un dato incoraggiante che ci permetterà di poter passare alla fase successiva della nostra sperimentazione mediante protocollo TaqMan.

	RNA ng/ μ l	A260/280
P1	12,8	1,68
P2	13,1	1,7
P3	25,8	1,99
P4	8,4	1,86
P5	42,5	1,67
P6	26,6	1,46
P7	8,5	1,68
P8	23,5	1,83
P9	9,4	2,09
P10	14,5	1,92
P11	5,4	2,43
P12	18,4	1,62
P13	6,4	1,88
P14	15,7	1,5

Tabella 3.1 Quantitativo RNA e rapporto di assorbanza ottenuti da saliva

La concentrazione media di RNA ottenuta dal Brushing è stata di 59,40625 quindi un valore ancora più alto rispetto a quella ottenuta da saliva intera.

	RNA ng/ μ l	A260/280
P1	-	-
P2	7,3	1,92
P3	127,1	2,08
P4	48,5	1,98
P5	41,8	1,93
P6	71,7	2,07
P7	15,5	1,89
P8	115,6	1,97
P9	3,9	1,70
P10	123,7	1,96
P11	25,3	2,03
P12	38,1	2,00
P13	46,4	2,00
P14	132,6	2,02

Tabella 3.2 Quantitativo di RNA e rapporto di assorbanza ottenuti da brushing

3.3 RNA quality

Il rapporto di assorbanza A260/A280 per i campioni preparati utilizzando il metodo TRIzol è paragonabile a quello dei campioni isolati utilizzando il metodo di estrazione su colonna. Tuttavia, con il metodo TRIzol è stato ottenuto un rapporto assorbente più elevato.

3.4 TaqMan Advanced MirnaAssay

La nostra sperimentazione ci ha consentito di ottenere una quantità sufficiente di RNA tale da poter passare alla fase di sperimentazione successiva (circa 5ng/ml), applicando quello che viene definito protocollo TaqMan.

I saggi TaqManTM Advanced miRNA sono set di primer e sonde preformati progettati per analisi dei livelli di espressione dei microRNA (miRNA) utilizzando gli strumenti PCR in tempo reale Applied BiosystemsTM.

I test possono rilevare e quantificare la forma matura del miRNA dai seguenti tipi di campioni:

- 1–10 ng di RNA totale dal tessuto;
- 2 µL di eluente del campione ottenuto dall'isolamento dell'RNA totale da siero o plasma o saliva.

Il kit di sintesi cDNA miRNA Advanced TaqManTM è necessario per preparare il modello di cDNA utilizzato con i test TaqManTM Advanced miRNA. Il kit consente l'analisi di:

- Più miRNA da un singolo campione amplificato;
- Campioni in quantità limitata, inclusi siero, plasma o altri fluidi biologici.

Nella prima fase del flusso di lavoro, i miRNA maturi dell'RNA totale vengono modificati estendendo l'estremità 3' della trascrizione matura tramite addizione di poli(A), quindi allungando l'estremità 5' mediante adattatore legatura. I miRNA modificati subiscono quindi la trascrizione inversa universale seguita dall'amplificazione per aumentare uniformemente la quantità di cDNA per tutti i miRNA (reazione miR-Amp).

I saggi TaqManTM Advanced miRNA di interesse vengono quindi utilizzati per la quantificazione dell'espressione del livello di miRNA mediante analisi qPCR. Per la maggior parte dei casi sono disponibili test miRNA avanzati TaqManTM preimpostati miRNA umani in miRBase. In questa seconda fase andremo quindi a selezionare i miRNA di nostro interesse, in accordo con i dati presenti in letteratura, per poi procedere alla loro amplificazione.

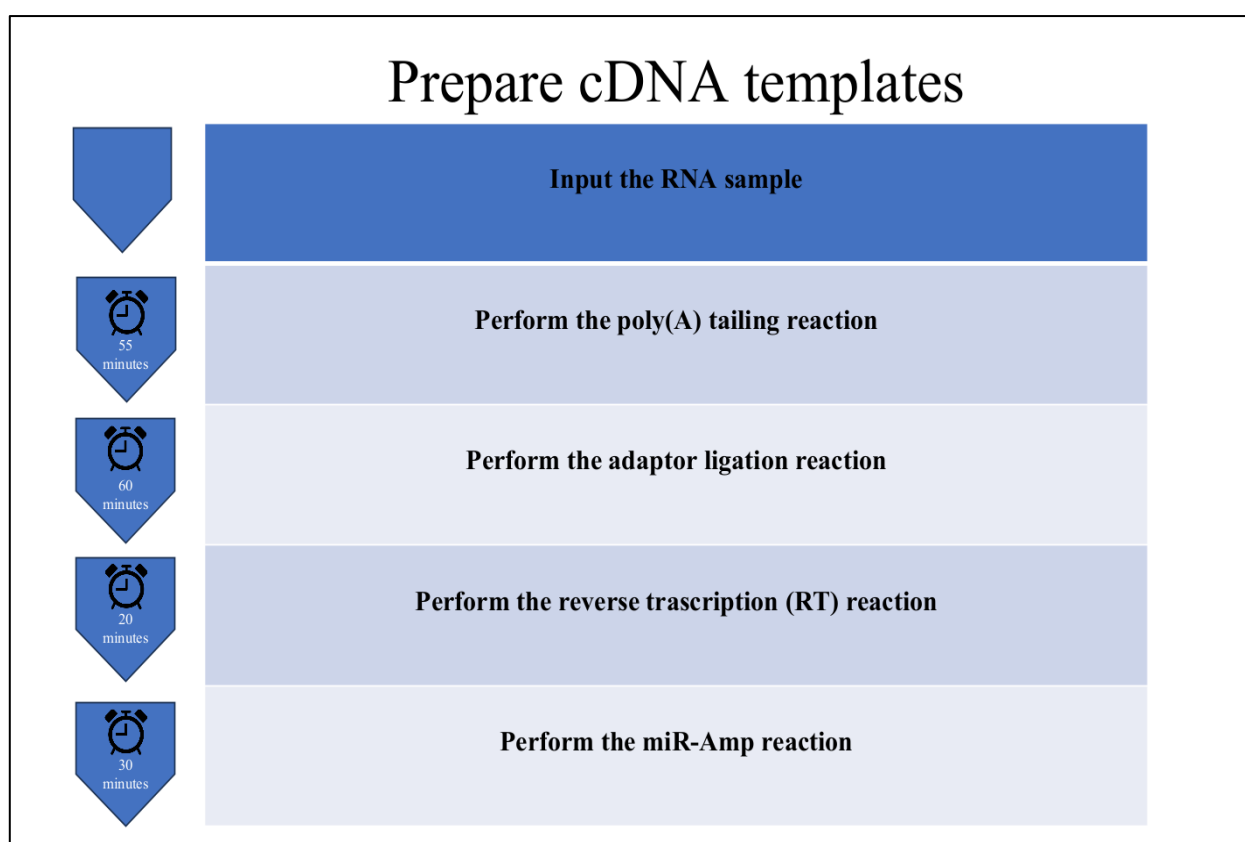


Figura 3.2 TaqMan workflow prima fase

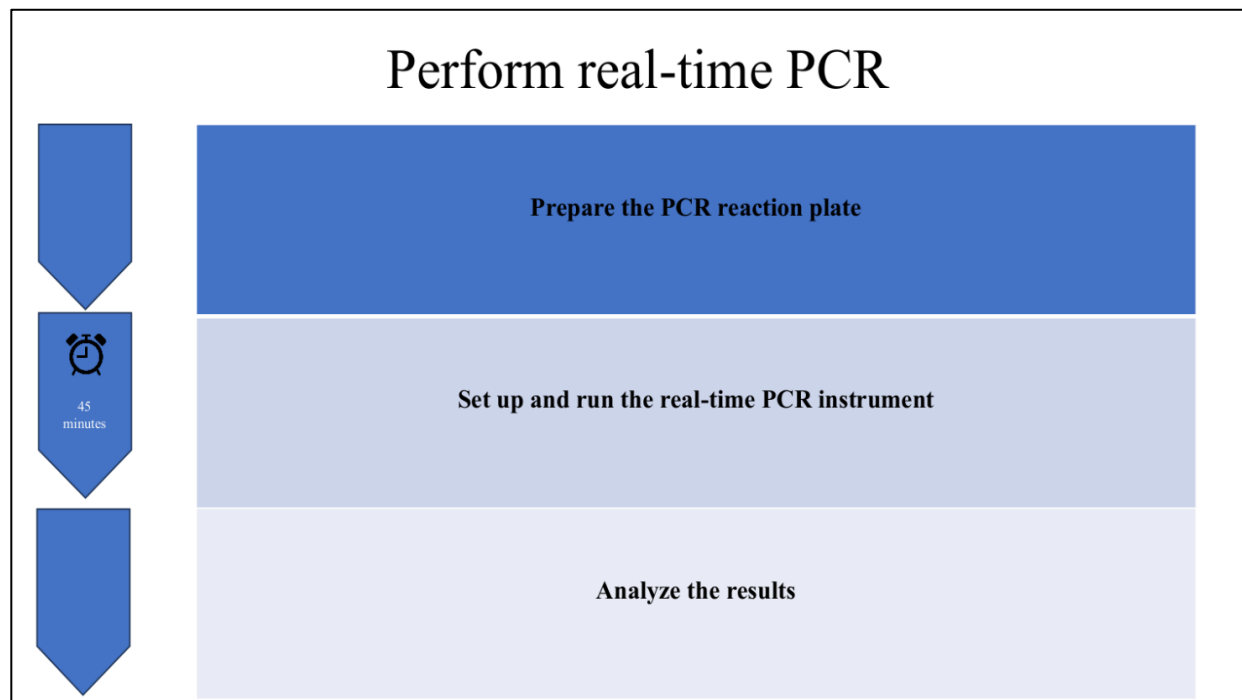


Figura 3.3 TaqMan workflow seconda fase

4. DISCUSSIONE

Il carcinoma orale a cellule squamose (OSCC) è il tumore maligno orale più diffuso in tutto il mondo, con un tasso di sopravvivenza a cinque anni solo del 50%. Una diagnosi precoce da parte delle cure primarie di medici o odontoiatri può avere un notevole impatto positivo sulla sua prognosi. Tuttavia, l'assenza di sintomi nelle fasi iniziali e la mancata consapevolezza da parte dei pazienti dei fattori di rischio (tabacco e alcol), fanno sì che la diagnosi venga spesso posta in fase avanzata, peggiorando la prognosi e aumentando il tasso di mortalità.^{[71][72][73]}

Il metodo diagnostico di scelta è eseguire una biopsia, ma può rappresentare una procedura invasiva che necessita di personale qualificato. Sarebbe quindi auspicabile la messa a punto di tecniche più efficaci per garantire un risultato tempestivo e una diagnosi affidabile.^[74] Le tecniche molecolari hanno attirato sempre più attenzione, in quanto possono offrire una diagnosi precoce e accurata, garantendo un maggiore successo terapeutico e riducendo i tassi di recidiva.^[75]

La saliva umana contiene citochine, molecole di DNA e RNA, cellule circolanti e derivati di tessuti e vescicole extracellulari (EV), che possono rappresentare potenziali biomarcatori. Pertanto, l'analisi della saliva può fornire informazioni utili per la diagnosi precoce diagnosi di OSCC per la sua prognosi.^[71]

Biomarker	Findings	Clinical Relevance
miRNA-24- miRNA 3P miRNA412-3p miRNA 512-3p miRNA302b-3p miRNA 517b-3p miRNA 134 miRNA 486-5p miRNA 4484 miRNA 10b-5p miRNA 200a miRNA 365	Correlated with disease stage, histopathological type, and/or grade of OSCC	Possible tool for the early diagnosis of OSCC; in general, the expression of these miRNAs indicates poor prognosis and higher risk of malignant transformation and oral cancer
miRNA-27b miRNA-200 miRNA-375 miRNA-26a miRNA-7 miRNA-107 miRNA-218 miRNA let-7 miRNA-125	Tumor-suppressor role	Increased levels of these biomarkers can be useful for the diagnosis, staging, and prognosis of OSCC; the expression of these miRNAs reduce the progression of OSCC
miRNA-21 miRNA-145 miRNA-93 miRNA-184 miRNA-31 miRNA-412-3p miRNA-34a	Tumor-activator role; these miRNAs acts as an oncogenes, promoting OSCC development and progression	Elevated concentrations in the saliva offer a reliable method to detect OSCC and potentially malignant oral lesions

Figura 4.1 MicroRNA salivari correlati alla diagnosi e alla prognosi del carcinoma del cavo orale

I miRNA sono piccole molecole di RNA a catena singola (19-21 nucleotidi) trascritte da RNA polimerasi cellulare e sottoposto a doppio taglio sequenziale nel nucleo (primario miRNA) e citoplasma (precursore miRNA). A seconda del loro livello di complementarità con il bersaglio, possono inibire l'RNA messaggero (mRNA) o la sua traduzione.^{[71][76][77]}

I miRNA possono essere rilasciati nei fluidi corporei come miRNA privi di cellule associate a proteine leganti l'RNA o impacchettati selettivamente in vescicole extracellulari.^[78] Sono coinvolti nella regolazione di vari processi biologici, come la differenziazione cellulare, la proliferazione, l'apoptosi e nello sviluppo embrionale e tissutale. La loro espressione non viene modificata nei tessuti o nei fluidi corporei ed è spesso tumore-specifica. Sono anche i principali regolatori dell'espressione genica e risultano quindi di grande utilità nel rilevare la fase prodromica della trasformazione maligna.^[81] Di conseguenza, l'analisi dei profili di miRNA nei

pazienti con il cancro rappresenta un nuovo paradigma nell'identificazione di biomarcatori per la diagnosi clinica di questa malattia.

L'espressione di alcuni miRNA nel microambiente tumorale è stata associata alla disregolazione degli oncosoppressori o degli oncogeni e va a contribuire allo sviluppo o all'inibizione dei tumori. I miRNA possono promuovere o inibire l'espressione dei geni bersaglio legandosi direttamente al loro mRNA bersaglio. Possono anche influenzare la stabilità dell'mRNA ^[79] e la regolazione aberrante dei miRNA e possono dare un contributo importante allo sviluppo del cancro.^[80] In questo modo, i miRNA con funzione oncogenica vengono sovraregolati e possono essere responsabili del silenziamento dei geni oncosoppressori che modulano l'insorgenza, lo sviluppo e la metastatizzazione delle cellule tumorali. Al contrario, miRNA con funzione di soppressore del tumore sono sotto regolati, riducendo la modulazione degli oncogeni e mantenendo la malignità.^[81]

Un vantaggio del miRNA esosomiale salivare rispetto ad altri biomarcatori OSCC è che esso può essere rilevato in piccole quantità di saliva mediante l'analisi dell'intero campione di saliva o il surnatante. I seguenti miRNA esosomiali salivari sono stati correlati con stadio della malattia, tipo e/o grado istopatologico: miRNA-24-3p, 412-3p, 512-3p, 302b-3p, 517b-3p, 134, 486-5p, 4484, 10b-5p, 200a e 365.^{[81][82][83][84]} In particolare, l'espressione di miRNA-34 risulta essere maggiore negli OSCC di alto grado e l'espressione di miRNA-486-5p aiuta il rilevamento dell'OSCC di stadio I, dimostrando la potenziale utilità dei miRNA esosomiali salivari per la diagnosi precoce del cancro.^[85] Allo stesso modo, è stato riscontrato che miRNA-4484 e 10b-5p sono biomarcatori della trasformazione maligna del lichen orale planus e della displasia orale nell'OSCC^{[81][85][82]} e un'espressione inferiore di miRNA-200a è stata associata ad un rischio più elevato di trasformazione maligna e di cancro orale. Finalmente, è stato scoperto che miR-365 regola la trascrizione, promuovendo l'oncogenesi e le metastasi in alcuni tumori ma sopprimendo questi processi in altri.^[86]

I miRNA con un ruolo di soppressore del tumore includono: miRNA-27b, che inibisce la proliferazione cellulare, la migrazione e invasione nell'OSCC^[88]; miRNA-200^[89], che inibisce la crescita cellulare ad aumentate concentrazioni salivari^[87]; miRNA-375, che agisce come soppressore del tumore in diversi tumori, incluso l'OSCC^[90]; e miRNA-26a, che inibisce la migrazione cellulare e la metastatizzazione e riduce l'espressione del potenziatore dell'omologo Zeste 2 (EZH2), riducendo la crescita cellulare^[92]. Molti miRNA soppressori del tumore agiscono inibendo l'espressione di geni che promuovono la proliferazione cellulare. Questi includono miRNA-7^[91], che inibisce l'espressione del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) e miRNA-107, che inibisce Geni Akt, Stat3 e Rho GTPasi attraverso la proteina chinasi C" (PKC").^[93] Altri oncosoppressori miRNA inibiscono la migrazione cellulare, l'invasione e le metastasi interferendo con cascate di segnalazione, tra cui: miR-218^[94], che inibisce la via di adesione focale, impedendo la migrazione cellulare; alcuni membri della famiglia dei miRNA let-7^[95]; e miRNA-125^[96].

Tutti i seguenti miRNA vengono rilevati a concentrazioni più elevate nella saliva di pazienti con OSCC rispetto a individui sani, offrendo un metodo affidabile per rilevare l'OSCC e lesioni orali potenzialmente maligne.^{[97][100]} miRNA-21 agisce come un oncogene, promuovendo lo sviluppo e la progressione dell'OSCC inibendo l'apoptosi.^[98] È un indicatore di trasformazione maligna, che indica un peggioramento prognosi e ridotta sopravvivenza.^[71] È stata trovata anche un'espressione aberrante di miR-145 per indicare una trasformazione maligna. miRNA-93 è stato associato all'OSCC, dimostrando espressione elevata a 12 mesi dopo la radioterapia.^[99] Questo miRNA può essere considerato un indicatore prezioso per prevedere la prognosi e il rischio di metastasi, data la significativa relazione trovata tra la sua alta espressione e il grado T, metastasi linfonodali e stadio clinico.^[101] Da parte sua, il miRNA-184 è ad oggi l'unico miRNA in grado di differenziare tra OSCC e malattie displastiche precancerose.^[98]

È stato segnalato miRNA-31 che aumenta la proliferazione, la migrazione e la crescita delle cellule OSCC in vitro e nei topi aumentandone il potenziale oncogenico.^[102] Non fa differenza

tra stadi tumorali ma è un buon indicatore della presenza di metastasi linfatiche. miR-412-3p è regolato positivamente e induce la progressione del cancro attraverso il fattore di crescita trasformante (TGF).^[101] Infine, miRNA-34a è sottoregolato ed espresso in modo differenziale nei pazienti con leucoplachia rispetto a individui sani ed è stata significativamente associato con l'aggressività locoregionale dei tumori e il loro grado istopatologico.^[98]

Le evidenze scientifiche raccolte indicano che la misurazione dei miRNA e di alcune citochine orali, come IL-6, IL-8; IL-1-B nella saliva, rappresenti una tecnica molto promettente per la diagnosi e la prognosi dell'OSCC.

Secondo lo studio di Aditi Patel et al., mRNA-1307-5p sembra avere un maggior livello di espressione nei pazienti con stadio III-IV di malattia e pazienti con elevata aggressività locoregionale(N1-N2-N3). Si riscontrano inoltre, livelli elevati in pazienti con resistenza al trattamento chemioterapico.

Una combinazione di miRNA salivari e dati proteomici potrebbe consentire una diagnosi precoce e certa della malattia. L'analisi di questi biomarcatori salivari insieme allo studio di altri marcatori istopatologici come la presenza di eosinofili e il fenotipo immunitario potrebbe essere un elemento chiave nello sviluppo di nuove strategie nel trattamento dell'OSCC.^{[103][104]}

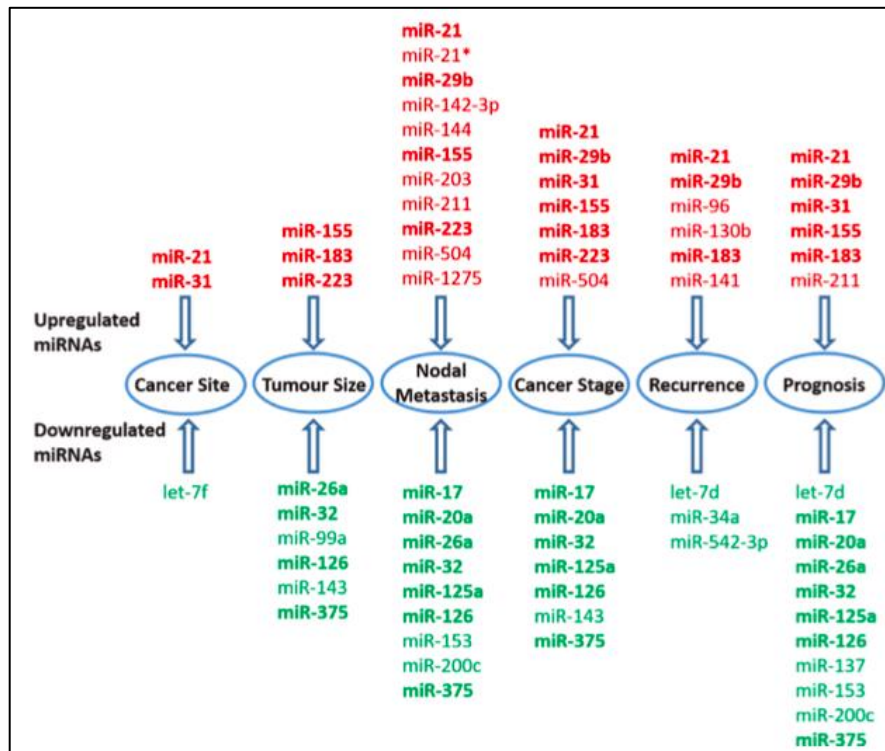


Figura 4.2. Esempi di microRNA coinvolti nello sviluppo del carcinoma orale. In verde i miRNA meno espressi nel tumore, in rosso quelli più espressi. In grassetto quelli correlati alla neoplasia. (Fonte: S. Yete, D. Saranath, MicroRnas in oral cancer: Biomarkers with clinical potential, Oral Oncology, vol.110, p. 1-10, Elsevier, 2020).

Nonostante i recenti progressi nelle strategie di trattamento, fattori come metastasi, invasione loco-regionale e refrattarietà terapeutica possono influenzare la prognosi dei pazienti in modo sfavorevole e, in definitiva, contribuire ad un basso tasso di sopravvivenza globale. La determinazione dell'aggressività loco-regionale e della presenza di metastasi durante la stadiazione iniziale può migliorare la sopravvivenza e ridurre la somministrazione di trattamenti aggressivi nel corso della malattia. L'approccio convenzionale per determinare l' aggressività dei tumori dipende dalle metodiche di imaging. I tassi di recidive regionali, locoregionali e locali nei pazienti con OSCC sono rispettivamente del 31,2-62,6%, 4,1-16,3% e 24-51,1%; tali recidive alla fine indicano che i pazienti debbano sottoporsi a processi diagnostici ripetitivi.^[103] Pertanto, è necessario individuare i fattori chiave che determinano la prognosi dell'OSCC e identificare marcatori robusti che possono fornire informazioni sulla prognosi della malattia.

L'identificazione di biomarcatori validati in grado di predire il rischio di recidiva e lo sviluppo di metastasi è cruciale per una gestione terapeutica più mirata e personalizzata.

Infatti, l'identificazione di biomarcatori predittivi potrebbe consentire di adottare approcci terapeutici più aggressivi o specifici per i pazienti a rischio più elevato, mentre quelli a rischio più basso potrebbero comunque beneficiare dei trattamenti all'avanguardia. Ciò potrebbe migliorare non solo la sopravvivenza ma anche la qualità della vita dei pazienti affetti da cancro orale evitando trattamenti errati. Alcuni dei vantaggi associati a un modello di previsione basato su marcatori biologici potrebbero essere l'identificazione precoce della neoplasia, consentendo una diagnosi più precoce e maggiori possibilità di un trattamento efficace.

Inoltre, i marcatori consentono di valutare il comportamento biologico del tumore: come l'aggressività (diffusione locoregionale e/o metastatica) o la risposta a trattamenti specifici. Un ulteriore vantaggio è il monitoraggio della risposta al trattamento: un modello di previsione basato su marcatori biologici può essere utilizzato per monitorare la risposta di un paziente a un trattamento specifico nel tempo.

Il progetto europeo BD2Decide (Big Data to Decide) rappresenta un esempio preliminare di successo di come i nuovi biomarcatori possano implementare la previsione della prognosi e influenzare la selezione del miglior trattamento per i pazienti con cancro orale. Nel caso del progetto è stata raccolta una enorme quantità di informazioni cliniche, patologiche, demografiche, trascrittomiche e radiomiche (Big Data) derivanti da un'ampia coorte di pazienti con carcinoma a cellule squamose localmente avanzato (stadio III-IVA/B) della regione della testa e del collo dopo aver ricevuto un trattamento curativo. caricati in un database dedicato. Quindi sono state eseguite analisi Big Data per valutare il ruolo prognostico di presunti nuovi biomarcatori e firme genomiche.

5. CONCLUSIONI

L'Unità Operativa di Chirurgia Maxillo Facciale dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Parma, in collaborazione con il Dipartimento di Medicina Sperimentale dell'Università di Parma, ha avviato uno studio prospettico focalizzato sulla raccolta e analisi di campioni di saliva prelevati da pazienti trattati chirurgicamente per carcinoma a cellule squamose del cavo orale e monitorata clinicamente durante il follow-up. Lo scopo è quello di identificare biomarcatori genomici, in particolare miRNA, attraverso il campionamento non invasivo del fluido biologico salivare. Attraverso le indagini di laboratorio, inclusa la spettrometria di massa, verrebbero identificati potenziali biomarcatori utili nella diagnosi precoce delle recidive tumorali. Inoltre, ci proponiamo di estendere lo studio anche al basale prima del trattamento chirurgico, determinando marcatori biologici espressi dalla neoplasia che sarebbero utili a fini diagnostici e prognostici.

I pazienti reclutati nello studio vengono sottoposti sia a prelievo salivare che a spazzolamento della mucosa orale, senza alcun tipo di lavaggio e disinfezione del cavo orale prima del prelievo. Dalle nostre analisi preliminari è emerso che il protocollo TriZol modificato rappresenta un ottimo metodo di estrazione di RNA e verrà adottato per l'analisi di tutti i nostri campioni.

Lo studio, se pur in fase iniziale, rappresenta il futuro della stratificazione del rischio nei pazienti affetti da carcinoma squamocellulare del cavo orale e in accordo con i dati della letteratura, l'obiettivo futuro sarebbe quello di sottoporre tutti i pazienti candidati a trattamento curativo, a raccolta di saliva e brushing della mucosa in modo da predire il comportamento più o meno aggressivo della neoplasia.

Questo consentirà al nostro Centro, di riferimento per la cura della patologia neoplastica testa-collo, di eseguire trattamenti personalizzati e follow-up basati sulle caratteristiche del paziente.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Cancer.net <https://www.cancer.net/cancer-types/oral-and-oropharyngeal-cancer>.
- [2] V. Kumar, A. K. Abbas, J. C. Aster, *Robbins e Cotran, Le Basi Patologiche delle Malattie. Patologia generale*, IX edizione, Vol.1, Cap. 7., p. 271-310, 2015.
- [3] G. Anastasi et Al., *Trattato di Anatomia Umana*, IV edizione, vol.2, p. 19-21, 2010.
- [4] C. Rivera, *Essential of Oral Cancer*, International Journal of Clinical Experimental Pathology, vol.8 p. 11884-11894, 2015.
- [5] Global Cancer Observatory, Cancer Today, <http://gco.iarc.fr/today> : last consultation 31 May 2023
- [6] V. Kumar, A. K. Abbas, J. C. Aster, *Robbins e Cotran, Le Basi Patologiche delle Malattie, Malattie degli Organi e degli Apparati*, IX edizione, Vol.2, Cap. 16 p. 708712, 2015.
- [7] M. Kumar, R. Nanavati, T. G. Modi, C. Dobariya; *Oral cancer: Etiology and risk factors: A Review*; Journal of Cancer Research and Therapeutics, Volume 12, Issue 2, p. 458-463, April-June 2016.
- [8] G. Sarode, N. Maniyar, S. C. Sarode, M. Jafer, S. Patil, K. H. Awan; *Epidemiological aspects of oral cancer*, Disease-a-month 66, 100988, p. 1-8, Elsevier, 2020.
- [9] M. B. C. Maymone, R. O. Greer, J. Kesecker, P. C. Sahitya, L. K. Burdine, A. Cheng, A. C. Maymone, N. A. Vashi; *Premalignant and malignant oral mucosal lesions: Clinical And pathological findings*, Journal of the American Academy of Dermatology, Volume 8 Issuep.59 71, Elsevier, 2019.
- [10] V. Sharma, A. Nandan, A. K. Sharma, H. Singh, M. Bharadwaj, D. N. Sinha, R. Mehrotra, *Signature of genetic associations in oral cancer*, Tumor Biology, p. 1-7, 2017.

- [11] D. E. Johnson, B. Burtness, C. R. Leemas, V. Wai Yan Lui, J. E. Bauman, J. R. Grandis, *Head and neck squamous cell carcinoma*, Nature Review, Disease Primers, 6:92, p. 1-22, 2020.
- [12] T. Sasahira, T. Kirita, *Hallmarks of Cancer-Related Newly Prognostic Factors of Oral Squamous Cell Carcinoma*, International Journal of Molecular Science, vol.19, 2413, 2
- [13] National Comprehensive Cancer Network, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Head and Neck Cancers. Version 2.2014, NCCN, 2014 May 30th.
- [14] Tan P.K. Downey T.J. Spitznagel E.L. Xu P. Fu D. Dimitrov D.S. Lempicki R.A. Raaka B.M. Cam M.C., «Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms», Nucleic Acids Res, 31:5676–84, 2003. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg763>
- [15] Union for International Cancer Control UICC.org ultima consultazione il 20 maggio 2022.
- [16] S. H. Huang, B. O’Sullivan, *Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer*, Current Treatment Options in Oncology, 18:40, p.1-13, Springer, 2017.
- [17] A. Almangush, A. A. Mäkitie, A. Triantafyllou, R. de Bree, P. Strojan, A. Rinaldo, J. C. Hernandez-Perra, C. Suárez, L. P. Kowalski, A. Ferlito, I. Leivo; *Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: An update*, Oral Oncology 107, 104799, p. 1-6, Elsevier, 2020.
- [18] Associazione Italiana di Oncologia Medica AIOM, *Linee guida tumori della testa e del collo*, edizione 2021, p.14-17; 78-82, 2022.
- [19] K. Pollaers, A. Hinton-Bayre, P. L. Friedland, C. S. Farah, *AJCC 8th Edition oral cavity squamous cell carcinoma staging – Is it improvement on the AJCC 7th Edition*, Oral Oncology, vol. 82, p. 23-28, 2018.
- [20] Nagathihalli S. Nagaraj, «Evolving ‘omics’ technologies for diagnostics of head and neck cancer», Briefings in Functional Genomics, Volume 8, Issue 1, Pages 49–59, January 2009.

<https://doi.org/10.1093/bfgp/elp004>

- [21] C. Moore, J. C. Kuhns, R. A. Greenberg, *Thickness as prognostic aid in upper aerodigestive tract cancer*, Archives of Surgery, 121:1410-4, 1986.
- [22] W. M. Lydiatt, S. G. Patel, B. O'Sullivan, M. S. Brandwein, J. A. Ridge, J. C. Migliacci, A. M. Loomis, J. P. Shah, *Head and Neck Cancers-Major Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual*, Cancer Journal for Clinicians, vol. 67, p. 122-137, 2017.
- [23] M. B. Amin and all Editorial Board, *American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Staging Manual*, 8a edizione, Springer, p. 79-94, 2017.
- [24] L. L. Matos, R. A. Dedivitis, M. A. V. Kulcsar, E. Sobrosa de Mello, V. A. F. Alves, C. R. Cernea, *External validation of the AJCC Cancer Staging Manual, 8th edition, in an independent cohort of oral cancer patients*, Oral Oncology, vol.71, p. 47-53, 2017, Elsevier.
- [25] A. W. Barrett, M. K. Pratt, I. Sassoon, B. S. Bisase, L. Newman, J. V. Tighe, P. M. Norris, J. Dhanda, A. Gulati, *Perineural and lymphovascular invasion in squamous cell carcinoma of the tongue*, Journal of Oral pathology & Medicine, vol.50, p. 32-38, Wiley online Library, 2021.
- [26] J. F. Jardim, A. L. N. Francisco, R. Gondak, A. Damascena, L. P. Kowalski, *Prognostic impact of perineural invasion and lymphovascular invasion in advanced stage oral squamous cell carcinoma*, International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery, vol.44, p. 23-28, 2015.
- [27] H. B. Jones, A. Sykes, N. Bayman, P. Sloan, R. Swindell, M. Patel, B. Musgrove, *The impact of lymphovascular invasion on survival in oral carcinoma*, Oral oncology, Science Direct, vol. 45, p. 10-15, 2008.
- [28] K. C. Ting, T. L. Lee, W. Y. Li, C. F. Chang, P. Y. Chu, Y. F. Wang, S. K. Tai, *Perineural*

invasion/lymphovascular invasion double positive predicts distant metastasis and poor survival

T3-T4 oral squamous cell carcinoma, Scientific Reports Nature, 11:19770, p. 1-9, 2021.

[29] T. C. Chen, C. P. Wang, J. Y. Ko, T. L. Yang, C. W. Hsu, K. A. Yeh, Y. L. Chang, P. J. Lou, *The*

Impact of Perineural Invasion and/or Lymphovascular Invasion on the Survival of Early-Stage Oral Squamous Cell Carcinoma Patients, Annals of Surgical Oncology, vol. 20, p. 2388-2395, 2013.

[30] Y. Aaboubout, I. ten Hove, R. W. H. Smits, J. A. Hardillo, G. J. Puppels, S. Koljenovic, *Specimen-driven intraoperative assessment of resection margins should be standard of care for oral cancer patients*, Oral Disease, vol. 27, p- 111-116, 2021.

[31] De Cecco L. Nicolau M. Giannoccaro M. Daidone M.G. Bossi P. Locati L. Licitra L. and Canevari S., «Head and neck cancer subtypes with biological and clinical relevance: Meta-analysis of gene-expression data», Oncotarget, 6:9627-9642, 2015.

[32] J. Y. Jang, N. Choi, Y. H. Ko, M. K. Chung, Y. I. Son, C. H. Baek, K. H. Baek, H. S. Jeong, *Differential Impact of Close Surgical Margin on Local Recurrence According to Primary Tumor Size in Oral Squamous Cell Carcinoma*, Annals of Surgical Oncology, vol. 24, p. 1698-1706, 2017.

[33] M. Szewczyk, P. Golusinski, J. Pazdrowski, W. Golusinski, *Prognostic Factors associated With Successful Salvage Surgery in Recurrent Oral Cancer*, Diagnostics, MDPI, Vol. 11, 1105, p. 1-12, 2021.

[34] A. Malik, A. Mishra, P. Chopda, H. Singhvi, S. Nair, D. Nair, S. G. Laskar, K. Prabhash, J. P.

Agarwal, P. Chaturvedi, *Impact of age on elderly patients with oral cancer*, European Archives of

Oto-Rhino-Laryngology, vol. 276, p. 223-231, 2019.

[35] S. Abati, C. Bramati, S. Bondi, A. Lissoni, M. Trimarchi, *Oral Cancer and Precancer: a narrative review on the relevance of early diagnosis*, International Journal of Environmental Research and Public Health, vol.17, p.1-14, 2020.

[36] T. S. C. Wong, D. Wiesenfeld, *Oral Cancer*, Australian Dental Journal, vol.63, p. S91-S99, Wiley Online Library, 2018.

[37] R. de Bree, B. de Keizer, F. J. Civantos, R. P. Takes, J. P. Rodrigo, J. C. Hernandez-Prera, G. B. Halmos, A. Rinaldo, A. Ferlito, *What is the role of sentinel lymph node biopsy in the management of oral cancer in 2020?*, European Archives of Oto-Rhino-Laryngology, p. 3181-3191, 2020.

[38] R. de Bree, O. E. Nieweg, *The History of sentinel node biopsy in head and neck cancer: From visualization of lymphatic vessels to sentinel nodes*, Oral Oncology, vol. 51, p. 819-823, 2015, Elsevier.

[39] M. Hamoir, S. Schmitz, V. Gregoire, *The Role of Neck Dissection in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck*, Head and Neck Cancer, Current Treatment Options in Oncology, 15: 611-624, Springer Science, 2014.

[40] R. de Bree, R. P. Takes, J. P. Shah, M. Hamoir, L. P. Kowolski, K. T. Robbins, J. P. Rodrigo, A. Sanabria, J. E. Medina, A. Rinaldo, A. R. Shaha, C. Silver, C. Suárez, M. Bernal-Sprekelsen, A. Ferlito, *Elective neck dissection in oral squamous cell carcinoma: Past, present and future*, Oral Oncology 90, p.87-93, Elsevier, 2019.

[41] N. Y. Lee, N. D. Gross, S. Okuno, S. S. D: Rao, *Treatment of locoregionally advanced (stage III and IV) head and neck cancer: the oral cavity*, UpToDate, 2020.

[42] M. Brands, A. Verbeek, S. Geurts, T. Merckx, *Follow-up after oral cancer treatment-*

Transition to a personalized approach, Journal of Oral Pathology and Medicine, p. 429-434, Wiley

Online Library, 2020.

[43] I. P. Ribeiro, L. Esteves, A. Santos, L. Barroso, F. Marques, F. Caramelo, J. Barbosa Melo, I. Marques Carreira, *A seven-gene signature to predict the prognosis of oral squamous cell carcinoma*, Oncogene Springer Nature, 40: 3859-3869, 2021.

[44] J. P. Machiels, C. R. Leemans, W. Golusinski, C. Grau, L. Licitra, V. Gregoire, on behalf of The EHNS Executive Board, ESMO Guidelines Committee and ESTRO Executive Board, *Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*, Annals of Oncology, volume 31, Issue11, p.1462-1475, 2020.

[45] M. T. Brands, E. A. J. Smeekens, R. P. Takes, J. H. A. M. Kaanders, A. L. M. Verbeek, M. A.

WMerkx, S. M. E. Geurts, *Time patterns of recurrence and second primary tumors in a large cohort of patients treated for oral cavity cancer*, Cancer Medicine, vol.8, p. 5810-5819, 2019.

[46] R. Mroueh, A. Nevala, A. Haapaniemi, J. Pitkaniemi, T. Salo, A. A. Mäkitie, *Risk of second primary cancer in oral squamous cell carcinoma*, Head & Neck, p.1848-1858, Wiley Online Library,2020.

[47] Q. Hu, T. Wu, X. Chen, H. Li, Z. Du, Y. Hao, J. Peng, S. Tai, M. Song, B. Cheng, *The poor outcome of second primary oral squamous cell carcinoma is attributed to Bmi1 upregulation*, Cancer medicine, vol. 7, p. 1056-1069, 2018.

[48] Douglas A. Granger, PhD^{a,b,c}, Sara B. Johnson, PhD, MPH^{b,c}, Sarah L. Szanton, PhD, CRNPa, and Dorothée Out, PhD^a; *Incorporating Salivary Biomarkers into Nursing Research: An Overview and Review of Best Practices*. Biol Res Nurs. 2012 October ; 14(4): 347–356.

[49] M. Andratschke, S. Schmitz, H. Hagedorn, A. Nerlich, *Cytological and Immunocytological*

Monitoring of Oropharyngeal Dysplasia and Squamous Cell Carcinomas, Anticancer Research, 35:6517-6529, 2015.

[50] D. B. Gissi, A. Tarsitano, A. Gabusi, R. Rossi, G. Attardo, J. Lenzi, C. Marchetti, L. Montebugnoli, M. P. Foschini, L. Morandi, *13-gene DNA Methylation Analysis from OralBrushing: A Promising Non Invasive Tool in the Follow-up of Oral Cancer Patients*, Journal of Clinical Medicine, vol.8, art. 2107, p. 1-15, MDPI, 2019.

[51] M. Imbimbo, S. Alfieri, L. Botta, C. Bergamini, A. Gloghini, G. Calareso, E. Orlandi, N. A. Iacovelli, M. Guzzo, R. Granata, C. Resteghini, L. Locati, C. C. Volpi, L. Licitra, P. Bossi, *Surveillance of Patients with Head and Neck Cancer with an Intensive Clinical and Radiologic Follow-up*, Otolaryngology-Head and Neck Surgery, vol.16(4), p. 635-642, 2019.

[52] Q. Li, X. Ouyang, J. Chen, P. Zhang, Y. Feng, *A Review on Salivary Proteomics for Oral Cancer Screening*, Current Issues in Molecular Biology, vol.37, p.47-56, 2020.

[53] Ó. Rapado-González, C. Martínez-Reglero, Á. Salgado-Barreira, B. Takkouche, R. López López, M. M. Suárez-Cunqueiro, L. Muinelo-Romay, *Salivary biomarker for cancer diagnosis:*

a meta-analysis, Annals of Medicine, vol.52:3-4, p. 131-144, 2020.

[54] A. B. Santosh, T. Jones, J. Harvey, *A review on oral cancer biomarkers: Understanding the past and learning from the present*, Journal of Cancer Research and Therapeutics, vol.12: p. 486-492, 2016.

[55] J. Wang, X. Chen, Y. Tian, G. Zhu, Y. Qin, X. Chen, L. Pi, M. Wei, G. Liu, Z. Li, C. Chen, Y.

Lv, G. Cai, *Six-gene signature for predicting survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma*, Aging-Us.com, Vol.20, No.1, p. 767-783, 2020.

[56] L. Zhong, Y. Liu, K. Wang, Z. He, Z. Gong, Z. Zhao, Y. Yang, X. Gao, F. Li, H. Wu, S. Zjang, L. Chen, *Biomarkers: paving stones on the road towards the personalized precision medicine foR oral squamous cell carcinoma*, BMC Cancer, 18:911, p. 1-20, 2018.

- [57] Q. Wang, P. Gao, X. Wang, Y. Duan, *The early diagnosis and monitoring of squamous cell carcinoma via saliva metabolomics*, Scientific Reports Nature, 4: 6802, p.1-8, 2014.
- [58] S. Ishikawa, M. Sugimoto, K. Kitabatake, A. Sugano, M. Nakamura, M. Kaneko, S. Ota, K. Hiwatari, A. Enomoto, T. Soga, M. Tomita, M. Iino, *Identification of salivary metabolomic biomarkers for oral cancer screening*, Scientific reports Nature, 6:31520, p.1-6, 2016.
- [59] C. C. Wu, H. W. Chu, C. W. Hsu, K. P. Chang, H. P. Liu, *Saliva proteome profiling reveal potential salivary biomarkers for detection of oral cavity squamous cell carcinoma*, Proteomics Journal, vol.15, p. 3394-3404, 2015.
- [60] Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69:89-95. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- [61] Ilyin SE, Belkowski SM, Plata-Salamán CR. Biomarker discovery and validation: technologies and integrative approaches. *Trends Biotechnol.* 2004;22:411-416. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- [62]. Fábryová H, Celec P. On the origin and diagnostic use of salivary RNA. *Oral Dis.* 2014;20:146- 152. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- [63] Zhang L, Xiao H, Wong DT. Salivary biomarkers for clinical applications. *Mol Diagn Ther.* 2009;13:245-259. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- [64] Drobitch RK, Svensson CK. Therapeutic drug monitoring in saliva. An update. *Clin Pharmacokinet.* 1992;23:365-379. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- [65] Haeckel R, Hanecke P. The application of saliva, sweat and tear fluid for diagnostic purposes. *Ann Biol Clin (Paris).* 1993;51:903-910. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- [66] Jusko WJ, Milsap RL. Pharmacokinetic principles of drug distribution in saliva. *Ann New York Acad Sci.* 1993;694:36-47. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- [67] Lee YH, Wong DT. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. *Am J Dent.* 2009;22:241-248. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

- [68] Loo JA, Yan W, Ramachandran P, Wong DT. Comparative human salivary and plasma proteomes. *J Dent Res*. 2010;89:1016-1023. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- [69] Ali N, Rampazzo RCP, Costa ADT, Krieger MA. Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9306564. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- [70] Cheranova D, Gibson M, Chaudhary S, et al. RNA-seq analysis of transcriptomes in thrombin- treated and control human pulmonary microvascular endothelial cells. *Journal of Visual Experiments*. 2013;72:4393. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- [71] Cristaldi, M.; Mauceri, R.; Di Fede, O.; Giuliana, G.; Campisi, G.; Panzarella, V. Salivary Biomarkers for Oral Squamous Cell Carcinoma Diagnosis and Follow-Up: Current Status and Perspectives. *Front. Physiol*. 2019, 10, 1476. [[CrossRef](#)]
- [72] Guha, N.; Warnakulasuriya, S.; Vlaanderen, J.; Straif, K. Betel quid chewing and the risk of oral and oropharyngeal cancers: A meta-analysis with implications for cancer control. *Int. J. Cancer* 2014, 135, 1433–1443. [[CrossRef](#)] *Int. J. Mol. Sci*. 2021, 22, 12215 10 of 13
- [73] Jeng, J.H.; Chang, M.C.; Hahn, L.J. Role of areca nut in betel quid-associated chemical carcinogenesis: Current awareness and future perspectives. *Oral Oncol*. 2001, 37, 477–492. [[CrossRef](#)]
- [74] Bellairs, J.A.; Hasina, R.; Agrawal, N. Tumor DNA: An emerging biomarker in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2017,36, 515–523. [[CrossRef](#)]
- [75] Woolgar, J.A. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2006, 42,229–239. [[CrossRef](#)]
- [76] Bartel, D.P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004, 116, 281–297. [[CrossRef](#)]
- [77] Perron, M.P.; Provost, P. Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function. *Front. Biosci*. 2008, 13, 2537–2547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- [78] Larrea, E.; Sole, C.; Manterola, L.; Goicoechea, I.; Armesto, M.; Arestin, M.; Caffarel, M.M.; Araujo, A.M.; Araiz, M.; Fernandez Mercado, M.; et al. New Concepts in Cancer Biomarkers: Circulating miRNAs in Liquid Biopsies. *Int. J. Mol. Sci.* 2016
- [79] Wu, B.; Xiong, X.; Jia, J.; Zhang, W. MicroRNAs: New actors in the oral cancer scene. *Oral Oncol.* 2011, 47, 314–319. [[CrossRef](#)] *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 12215 11 of 13
- [80] Sannigrahi, M.K.; Sharma, R.; Singh, V.; Panda, N.K.; Rattan, V.; Khullar, M. Role of Host miRNA Hsa-miR-139-3p in HPV-16- Induced Carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 2017, 23, 3884–3895. [[CrossRef](#)]
- [81] Faur, C.I.; Rotaru, H.; Osan, C.; Jurj, A.; Roman, R.C.; Moldovan, M.; Chirila, M.; Hedesiu, M. Salivary exosomal microRNAs as biomarkers for head and neck cancer detection-a literature review. *Maxillofac. Plast. Reconstr. Surg.* 2021, 43, 19. [[CrossRef](#)]
- [82] Byun, J.-S.; Hong, S.-H.; Choi, J.-K.; Jung, J.-K.; Lee, H.-J. Diagnostic profiling of salivary exosomal microRNAs in oral lichen planus patients. *Oral Dis.* 2015, 21, 987–993. [[CrossRef](#)]
- [83] Gai, C.; Camussi, F.; Broccoletti, R.; Gambino, A.; Cabras, M.; Molinaro, L.; Carossa, S.; Camussi, G.; Arduino, P.G. Salivary extracellular vesicle-associated miRNAs as potential biomarkers in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2018, 18, 439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [84] Farag, A.F.; Sabry, D.; Hassabou, N.F.; Alaa EL-Din, Y. MicroRNA-134/MicroRNA-200a Derived Salivary Exosomes are Novel Diagnostic Biomarkers of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Egypt. Dent. J.* 2021, 67, 367–377. [[CrossRef](#)]
- [85] Langevin, S.; Kuhnell, D.; Parry, T.; Biesiada, J.; Huang, S.; Wise-Draper, T.; Casper, K.; Zhang, X.; Medvedovic, M.; Kasper, S. Comprehensive microRNA-sequencing of exosomes derived from head and neck carcinoma cells in vitro reveals common secretion profiles and potential utility as salivary biomarkers. *Oncotarget* 2017, 8, 82459–82474. [[CrossRef](#)]
- [86] Coon, J.; Kingsley, K.; Howard, K.M. miR-365 (microRNA): Potential Biomarker in Oral Squamous Cell Carcinoma Exosomes and Extracellular Vesicles. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 5317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- [87] Al Rawi, N.; Elmabrouk, N.; Abu Kou, R.; Mkadmi, S.; Rizvi, Z.; Hamdoon, Z. The role of differentially expressed salivary microRNA in oral squamous cell carcinoma. A systematic review. *Arch. Oral Biol.* 2021, 125, 105108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [88] Momen-Heravi, F.; Bala, S. Emerging role of non-coding RNA in oral cancer. *Cell. Signal.* 2018, 42, 134–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [89] Akira, S.; Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2004, 4, 499–511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [90] Harris, T.; Jimenez, L.; Kawachi, N.; Fan, J.-B.; Chen, J.; Belbin, T.; Ramnauth, A.; Loudig, O.; Keller, C.E.; Smith, R.; et al. Low-level expression of miR-375 correlates with poor outcome and metastasis while altering the invasive properties of head and neck squamous cell carcinomas. *Am. J. Pathol.* 2012, 180, 917–928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [91] Kalinowski, F.C.; Giles, K.M.; Candy, P.A.; Ali, A.; Ganda, C.; Epis, M.R.; Webster, R.J.; Leedman, P.J. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling and erlotinib sensitivity in head and neck cancer cells by miR-7. *PLoS ONE* 2012, 7, e47067. [[CrossRef](#)]
- [92] Lu, Z.-M.; Lin, Y.-F.; Jiang, L.; Chen, L.-S.; Luo, X.-N.; Song, X.-H.; Chen, S.-H.; Zhang, S.-Y. Micro-ribonucleic acid expression profiling and bioinformatic target gene analyses in laryngeal carcinoma. *Onco Targets Ther.* 2014, 7, 525–533. [[CrossRef](#)]
- [93] Datta, J.; Smith, A.; Lang, J.C.; Islam, M.; Dutt, D.; Teknos, T.N.; Pan, Q. microRNA-107 functions as a candidate tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma by downregulation of protein kinase C β . *Oncogene* 2012, 31, 4045–4053. [[CrossRef](#)]
- [94] Kinoshita, T.; Nohata, N.; Hanazawa, T.; Kikkawa, N.; Yamamoto, N.; Yoshino, H.; Itesako, T.; Enokida, H.; Nakagawa, M.; Okamoto, Y.; et al. Tumour-suppressive microRNA-29s inhibit cancer cell migration and invasion by targeting laminin-integrin signalling in head and neck squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* 2013, 109, 2636–2645. [[CrossRef](#)]

- [95] Alajez, N.M.; Shi, W.; Wong, D.; Lenarduzzi, M.; Waldron, J.; Weinreb, I.; Liu, F.-F. Lin28b Promotes Head and Neck Cancer Progression via Modulation of the Insulin-Like Growth Factor Survival Pathway. *Oncotarget* 2012, 3, 1641–1652. [[CrossRef](#)]
- [96] Dlamini, Z.; Alaouna, M.; Mbatha, S.; Bhayat, A.; Mabongo, M.; Chatziioannou, A.; Hull, R. Genetic Drivers of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Aberrant Splicing Events, Mutational Burden, HPV Infection and Future Targets. *Genes* 2021, 12, 422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [97] Wiklund, E.D.; Gao, S.; Hulf, T.; Sibbritt, T.; Nair, S.; Costea, D.E.; Villadsen, S.B.; Bakholdt, V.; Bramsen, J.B.; Sørensen, J.A.; et al. MicroRNA alterations and associated aberrant DNA methylation patterns across multiple sample types in oral squamous cell carcinoma. *PLoS ONE* 2011, 6, e27840. [[CrossRef](#)]
- [98] Zahran, F.; Ghalwash, D.; Shaker, O.; Al-Johani, K.; Scully, C. Salivary microRNAs in oral cancer. *Oral Dis.* 2015, 21, 739–747.
- [99] Greither, T.; Vorwerk, F.; Kappler, M.; Bache, M.; Taubert, H.; Kuhnt, T.; Hey, J.; Eckert, A.W. Salivary miR-93 and miR-200a as post-radiotherapy biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 2017, 38, 1268–1275. [[CrossRef](#)]
- [100] Maheswari, T.N.U.; Venugopal, A.; Sureshbabu, N.M.; Ramani, P. Salivary micro RNA as a potential biomarker in oral potentially malignant disorders: A systematic review. *Tzu-Chi Med. J.* 2018, 30, 55–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [101] Liu, D.; Xin, Z.; Guo, S.; Li, S.; Cheng, J.; Jiang, H. Blood and Salivary MicroRNAs for Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2021, 79, 1082.e1–1082.e13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [102] Hung, P.-S.; Liu, C.-J.; Chou, C.-S.; Kao, S.-Y.; Yang, C.-C.; Chang, K.-W.; Chiu, T.-H.; Lin, S.-C. miR-146a Enhances the Oncogenicity of Oral Carcinoma by Concomitant Targeting of the IRAK1, TRAF6 and NUMB Genes. *PLoS ONE* 2013, 8, e79926.

- [103] Greither T, Vorwerk F, Kappler M, Bache M, Taubert H, Kuhnt T, Hey J, Eckert AW (2017) Salivary miR-93 and miR-200a as post-radiotherapy biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 38(2):1268–1275.
- [104] Salazar-Ruales C, Arguello JV, Lopez-Cortes A, Cabrera-Andrade A, Garcia-Cardenas JM, Guevara-Ramirez P et al (2018) Salivary microRNAs for early detection of head and neck squamous cell carcinoma: a case-control study in the high-altitude Mestizo Ecuadorian population. *Biomed Res* 2018
- [105] Granger DA, Johnson SB, Szanton SL, Out D, Schumann LL. Incorporating salivary biomarkers into nursing research: an overview and review of best practices. *Biol Res Nurs*. 2012;14:347-356. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

7. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Tito Poli per avermi dato la possibilità di intraprendere questo percorso di ricerca e per avermi accompagnato e supportato in questi anni.

Ringrazio il Prof. Silvano Ferrari per avermi reso il chirurgo che sono e per contribuire quotidianamente alla mia crescita umana e professionale.

Ringrazio la dott.ssa Ginevra Catola per avermi aiutato in questo percorso di ricerca ma soprattutto per essermi amica quotidianamente.

Ringrazio il dott. Davide Lanfranco per sopportarmi e supportarmi ormai da anni e la dott.ssa Francesca Zito per essere la spalla salentina su cui poter sempre contare.

Ringrazio tutti i colleghi dell'UO di Chirurgia Maxillo Facciale di Parma e tutti coloro che hanno contribuito alla realizzazione di questo progetto di ricerca.

Ringrazio tutta la mia famiglia perché nonostante la lontananza, è sempre nel mio cuore.

Ringrazio mia madre, perché senza di lei non sarei qui.

Ringrazio mia moglie Claudia e mio figlio Davide per farmi sentire ogni giorno così fortunato e orgoglioso, per farmi nutrire quotidianamente dei loro sorrisi.