

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE DELLO SVILUPPO E DEL MOVIMENTO UMANO
Prog. n° 2 SVILUPPO E RIPRODUZIONE UMANA

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza 05/H2 ISTOLOGIA
Settore Scientifico di afferenza BIO-17

TITOLO TESI

*“RICERCA DI MARCATORI BIOLOGICI NELLA PREVENZIONE DEI
TUMORI DI TESTA E COLLO”*

Presentata da: Dott.ssa GIRARDI AMBRA

Coordinatore Dottorato
Prof.ssa ELISABETTA CARAMELLI

Relatore
Dr. ANTONIO FARINA

Esame finale anno 2012

1. INTRODUZIONE

1.1.	CARCINOMA DEL CAVO ORALE	pg. 06
1.2.	EPIDEMIOLOGIA	pg. 07
1.3.	ASPETTI CLINICI ED ISTOPATOLOGICI	pg. 07
1.4.	STADIAZIONE	pg. 09
1.5.	SEDI DI INSORGENZA DEL TUMORE	pg. 10
1.5.1.	LINGUA	pg. 10
1.5.2.	GENGIVA	pg. 11
1.5.3.	LABBRO	pg. 12
1.5.4.	TRIGONO RETRO MOLARE	pg. 12
1.5.5.	GUANCIA	pg. 13
1.5.6.	PAVIMENTO ORALE	pg. 13
1.5.7.	PALATO	pg. 14
1.6.	EZIOPATOGENESI	pg. 14
1.6.1.	FATTORI AMBIENTALI	pg. 15
1.6.1.1.	<i>Tabacco</i>	pg. 15
1.6.1.2.	<i>Alcol</i>	pg. 15
1.6.1.3.	<i>Dieta e Nutrizione</i>	pg. 16
1.6.1.4.	<i>Microorganismi</i>	pg. 17
1.6.1.5.	<i>Infezioni Virali</i>	pg. 18
1.6.2.	SUSCETTIBILITA' GENETICA	pg. 18
1.7.	OSCC E PATOGENESI MOLECOLARE	pg. 19
1.7.1.	STIMOLAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE E DEL CICLO CELLULARE	pg. 20
1.7.2.	GENI ONCOSOPPRESSORI ED APOPTOSI	pg. 21
1.7.3.	IMMORTALIZZAZIONE	pg. 22
1.7.4.	ANGIOGENESI	pg. 22
1.7.5.	INVASIVITA' E METASTASI	pg. 23
1.8.	ANALISI DI PERDITA DI ETEROZIGOSI (LOH) E MICROSATELLITI	pg. 25
1.9.	miRNA	pg. 26

<u>2. SCOPO DELLA RICERCA</u>	pg. 29
<u>3. MATERIALI</u>	
3.1. CAMPIONI DI STUDIO	pg. 33
3.1.1. CAMPIONE PER L'ANALISI DI PERDITA DI ETEROZIGOSI (LOH)	pg. 33
3.1.2. CAMPIONE PER L'ANALISI DI ESPRESSIONE DEI MIRNA	pg. 34
3.1.3. CAMPIONE PER L'ANALISI DEL POLIMORFISMO RS2910164	pg. 35
3.2. ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO DA TESSUTI FRESCI	pg. 36
3.3. ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO DA TESSUTI INCLUSI IN PARAFFINA	pg. 36
3.4. PROGETTAZIONE DEI PRIMER ED AMPLIFICAZIONE IN PCR	pg. 36
3.5. ELETTROFORESI IN GEL D'AGAROSIO	pg. 39
3.6. ELETTROFORESI CAPILLARE	pg. 39
3.7. ANALISI LOH	pg. 41
3.8. PROFILO DI ESPRESSIONE DI miRNA	pg. 41
3.9. ANALISI DEI GENOTIPI DI POLIMORFISMO A SINGOLO NUCLEOTIDE	pg. 44
<u>4. METODI STATISTICI</u>	
4.1. FISHER EXACT TEST	pg. 47
4.2. EQUILIBRIO DI HARDY-WEINBERG	pg. 48
4.3. TEST DEL CHI ² DI INDIPENDENZA	pg. 50
4.4. RAPPORTO CROCIATO DI RISCHIO: ODD RATIO	pg. 51
4.5. ANALISI DEI MICROARRAY	pg. 53
<u>5. RISULTATI E DISCUSSIONE</u>	
5.1. ANALISI DELLA PERDITA DI ETEROZIGOSITA'	pg. 57
5.1.1. PREMESSA	pg. 57
5.1.2. RISULTATI	pg. 57
5.1.3. DISCUSSIONE	pg. 61

5.2. ANALISI DI ESPRESSIONE DI miRNA TRAMITE MICROARRAY	pg. 65
5.2.1. BACKGROUND SCIENTIFICO	pg. 65
5.2.2. RISULTATI	pg. 66
5.2.3. DISCUSSIONE	pg. 68
5.3. ANALISI DEL POLIMORFISMO rs2910164 in hsa-mir-146a	pg. 72
5.3.1. BACKGROUND SCIENTIFICO	pg. 72
5.3.2. RISULTATI	pg. 72
5.3.3. DISCUSSIONE	pg. 74
6. <u>CONCLUSIONI</u>	pg. 76
7. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	pg. 78

1. INTRODUZIONE

1.1. CARCINOMA DEL CAVO ORALE

Il cavo orale è una regione anatomica delimitata anteriormente dalla linea cutaneo-mucosa del labbro, e posteriormente dal margine posteriore del palato molle, dai pilastri palatini e dalle papille circumvallate del V linguale. Dal punto di vista oncologico, il carcinoma del cavo orale può coinvolgere le labbra, il pavimento della bocca, la porzione orale della lingua (corrispondente a 2/3 anteriori dell'organo), la mucosa delle guance, la gengiva superiore ed inferiore, il trigono retro molare ed il palato.

I tumori maligni che colpiscono tali sedi sono abbastanza frequenti, rappresentando circa il 10% dei tumori maligni del corpo umano e sono per lo più carcinomi, ovvero tumori che originano dall'epitelio di rivestimento, tuttavia possono osservarsi con minor frequenza anche tumori che derivano da epiteli ghiandolari (adenomi), tumori connettivali (fibrosarcomi, linfomi, rhabdomyosarcomi, melanomi) e tumori ossei della mandibola e del palato duro.

Le forme tumorali che colpiscono l'epitelio di rivestimento del cavo orale sono rappresentate prevalentemente dal carcinoma a cellule squamose (Oral Squamous Cells Carcinoma, OSCC), un tumore molto aggressivo, generalmente responsabile del 3% di tutte le morti nell'uomo e dell'1% nella donna.

La percentuale di sopravvivenza *disease-free* a 5 anni, dei pazienti affetti da OSCC è del 76% in assenza di metastasi alla diagnosi, del 41% quando siano interessati i linfonodi laterocervicali e solo del 9% qualora siano presenti metastasi a distanza. Purtroppo, nella maggior parte dei casi l'unico metodo diagnostico è la biopsia, che viene effettuata quando le lesioni cancerose sono sintomatiche, ovvero in stadi già avanzati [1]. Per questo motivo si rende necessario promuovere la diagnosi precoce di cancro orale [2].

Il trattamento del carcinoma del cavo orale si presenta particolarmente complesso in relazione alla sede del tumore, alla sua estensione e all'età in cui viene diagnosticato. In linea generale, il trattamento del carcinoma in fase non avanzata può prevedere il solo impiego della radioterapia o della chirurgia, mentre uno stadio neoplastico avanzato richiede un approccio polispecialistico multidisciplinare con l'interazione del chirurgo, dell'oncologo e del radioterapista.

1.2. EPIDEMIOLOGIA

Il cancro del cavo orale rappresenta il 6° tumore maligno in ordine di frequenza a livello mondiale [3]. Nel 2008, nel mondo, si sono registrati 263.900 nuovi casi e 128.000 decessi. Le aree con una maggior incidenza di OSCC sono la Melanesia, l'Asia sud-orientale ed il Sud-Est Europeo; viceversa, le zone con una minor incidenza sono l'Africa, l'America centrale e l'Est asiatico, per entrambi i sessi (Fig.1).

In Europa, si colloca all'8° posto tra le forme tumorali più frequenti e all'11° tra le cause di morte dovute a cancro, sebbene la sua incidenza ed il grado di mortalità varino notevolmente tra le diverse aree geografiche [4].

In Italia, l'incidenza media è di 8,44 nuovi casi ogni 100.000 abitanti di sesso maschile e di 2,22 per il sesso femminile. Nelle aree industrializzate e nelle valli alpine questa neoplasia incide più diffusamente: nel Nord-Est, con 14 nuovi casi ogni 100.000 individui maschi e a Torino con 10,7 nuovi casi ogni 100.000 individui maschi e 3 nuovi casi ogni 100.000 individui femmine.

L'epoca di vita più esposta è fra il VI° ed il VII° decennio [4]. Tale andamento epidemiologico in rapporto all'età, può essere collegato all'esposizione cumulativa dei fattori di rischio nel corso della vita, anche se non può essere trascurata una diffusione epidemiologica legata all'invecchiamento della popolazione [5].

La standardizzazione per sesso vede una prevalenza nei maschi, anche se negli ultimi anni il rapporto medio maschi/femmine è passato da 10:1 a 3:1 o addirittura a 2:1. Il cancro del cavo orale si manifesta, come per altri distretti, con frequenza crescente anche nelle donne [6].

1.3. ASPETTI CLINICI ED ISTOPATOLOGICI

I pazienti affetti ad OSCC, sono in genere individui che hanno notato la comparsa di un'alterazione della mucosa orale nella sede della neoplasia da 4 ad 8 mesi.

Il cavo orale, diversamente da quanto avviene per le altre sedi anatomiche, è ben esplorabile per cui la diagnosi precoce ed in controllo delle lesioni precancerose dovrebbero essere favoriti. Tuttavia, da un lato il dolore minimo avvertito dal paziente durante le fasi di accrescimento del tumore ed una scarsa sensibilità medica ai problemi del carcinoma orale e dall'altro il particolare tipo di paziente che viene colpito da questa malattia, etilista, fumatore e poco incline ai controlli medici se non in presenza del sintomo dolore, fanno sì

che la percentuale di tumori che giunge all'osservazione in fase avanzata sia di gran lunga superiore a quella dei tumori in fase precoce.

E' ben consolidata, infatti, l'idea di un processo di sviluppo del cancro a due fasi, secondo cui una lesione epiteliale (precancerosa) evolverebbe in cancro. La World Health Organization (W.H.O.) Collaborating Centre for Oral Precancerous Lesions, nel 1978, ha definito le lesioni precancerose del cavo orale come "alterazioni morfologiche della mucosa riferibili ad espressioni locali di malattie generalizzate (condizioni precancerose), ovvero a reazioni localizzate da fattori irritativi cronici, che hanno una probabilità di degenerare superiore a quella della mucosa normale circostante". Diverse lesioni orali come leucoplachia, eritroplachia, lichen planus e cheratosi sono considerate lesioni precancerose.

Le lesioni leucoplasiche sono le maggiormente diffuse tra le lesioni precancerose, mentre le eritroplastiche sono relativamente meno frequenti.

Istologicamente le lesioni precancerose orali si caratterizzano per le alterazioni tipiche delle cellule epiteliali, consistenti principalmente in una iperplasia squamosa senza cheratosi nei quadri meno gravi, fino alla comparsa di displasie di vario grado prima della progressione a carcinomi *in situ* nelle forme più aggressive.

L'iperplasia squamosa appare caratterizzata da un aumento di spessore degli strati basale e/o spinoso e dalla presenza anomala di cheratinizzazione dello strato superficiale (discheratosi). La discheratosi si definisce più specificamente paracheratosi od ortocheratosi a seconda se siano o meno presenti i nuclei nelle cellule più superficiali. La displasia invece é caratterizzata da alterazioni della morfologia cellulare, con possibili irregolarità della membrana nucleare, aumento di volume del nucleolo e del nucleo, incremento dell'attività mitotica con produzione di cellule immature, pleiomorfismo e riduzione della coesione intercellulare. Tali aspetti sono stati classificati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, a seconda della gravità della displasia, in tre stadi evolutivi sotto la sigla internazionale di O.I.N. I (Oral Intraepithelial Neoplasia I = Displasia Lieve), O.I.N. II (Oral Intraepithelial Neoplasia II = Displasia Moderata), O.I.N. III (Oral Intraepithelial Neoplasia III = Displasia Grave) (Tabella I).

DISPLASIA LIEVE (O.I.N. I)	Interessamento degli strati basali, pochi nuclei irregolari, segni di affollamento cellulare, mitosi assenti
DISPLASIA MODERATA (O.I.N. II)	Interessamento degli strati medi, nuclei tendenti all'irregolarità e addensamenti periferici della cromatina, alterazioni dei nucleoli, lieve discheratosi, mitosi degli strati basali
DISPLASIA GRAVE (O.I.N. III)	Iperplasia dell'epitelio con cheratinizzazione profonda, discheratosi, perdita totale della polarità cellulare, mitosi in tutti gli stadi

Tabella I. Classificazione della gravità delle displasie secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità

1.4. STADIAZIONE

Oltre all'importanza di conoscere il tipo istologico di tumore, è altrettanto importante conoscerne la stadiazione, ovvero lo stato di evoluzione della malattia.

Attualmente viene utilizzato un criterio ed un linguaggio unico definito TNM, concepito dalla Unione Internazionale Contro il Cancro (UICC).

L'acronimo TNM, si riferisce con la lettera T al tumore (dimensione e grado di infiltrazione), con N al nodulo linfatico (presenza e diffusione delle metastasi linfonodali) e con M all'eventuale presenza di metastasi a distanza.

Per quel che concerne il parametro T si possono distinguere tumori T1 con un'ampiezza fino a 2 cm, tumori T2 con un diametro fino a 4 cm, tumori T3 con un diametro superiore a 4 cm, e tumori T4 cioè maggiori di 4 cm che presentano infiltrazione di strutture ossee o muscolari profonde.

I linfonodi regionali sono classificati, dopo accurato esame obiettivo, come N0, quando non vi è evidenza clinica di interessamento linfonodale metastatico, N1, quando vi è interessamento di un singolo linfonodo omolaterale con dimensione massima fino a 3 cm, N2a, quando la metastasi sempre omolaterale è di dimensioni tra 3 e 6 cm, N2b, quando vi sono metastasi multiple omolaterali ma non superiori a 6 cm, N2c, quando vi sono metastasi bilaterali o controlaterali con dimensione massima di 6 cm, mentre l'N3 indica un'adenopatia metastatica di oltre 6 cm di diametro.

La definizione M0, M1 indica l'assenza o la presenza di metastasi a distanza.

Dopo l'intervento chirurgico la stadiazione clinica sarà riformulata in un TNM così detto patologico (pTNM), in modo più accurato, in base ai dati anatomopatologici forniti dall'esame del pezzo operatorio. Si potranno così tenere in considerazione anche eventuali

metastasi non clinicamente apprezzabili, nonché le loro caratteristiche di sede ed invasione da parte della neoplasia.

La classificazione TNM è nata dalla necessità di creare gruppi quanto più omogenei di pazienti con tumori delle stesse caratteristiche cliniche in modo da consentire studi statistici e da poter formulare un indice prognostico. La classificazione TNM permette anche di passare ad una classificazione semplificata che vede categorie più ampie chiamate stadi (Tabella II).

		Stadio I
T- Tumore Primario		T1N0M0
T0 - Nessuna evidenza di tumore		
Tis - Carcinoma <i>in situ</i>		Stadio II
T1 - Dimensioni fino a 2 cm		T2N0M0
T2 - Dimensioni fino a 4 cm		
T3 - Dimensioni superiori a 4 cm		Stadio III
T4 - Tumore che infiltra le strutture anatomiche		T1N1M0
		T2N1M0
N – Linfonodi Regionali		T3N0M0
N0 - Nessun Linfonodo Palpabile		T3N1M0
N1 - Linfonodi Palpabili omolaterali		
N2 - Linfonodi Palpabili Controlaterali o Bilaterali		Stadio IV
N3 - Linfonodi Palpabili, fissi, di grandi dimensioni		T1N2M0
		T1N3M0
M – Metastasi a Distanza		T2N2M0
M0 – Nessuna Metastasi a distanza		T2N3M0
M1 – Presenza di metastasi a distanza		T3N2M0
		T3N3M0
		Tutte le categorie T o N con M1

Tabella II. [colonna di sinistra] Classificazione TNM, in base alle caratteristiche del tumore (T), e alla presenza o meno di metastasi linfonodali (N) e/o a distanza (M).
[colonna di destra] Classificazione TNM in base agli stadi del tumore

1.5. SEDI DI INSORGENZA DEL TUMORE

1.5.1. LINGUA

La lingua mobile rappresenta una delle sedi più frequentemente coinvolte dai tumori del cavo orale (dal 17.5% al 36% dei casi). La diagnosi del carcinoma della lingua non è difficile; un'eventuale biopsia può essere di ausilio nelle forme ulcerate che molto possono assomigliare alle ulcere croniche da decubito.

Il tumore insorge prevalentemente sui margini della lingua, forse per l'irritazione cronica ivi esercitata da denti scheggiati o da protesi irregolari e segue, come frequenza, la zona di passaggio fra la punta e la superficie inferiore della lingua, mentre più raramente interessa il dorso.

I carcinomi del bordo della lingua si presentano frequentemente sotto forma ulcerata ed infiltrante; l'infiltrazione può raggiungere profondamente anche la linea mediana spesso superandola. Nella sua estensione in superficie il tumore tende a passare dalla lingua al pavimento della bocca. Analogamente, i tumori che originano dalla superficie inferiore della lingua raggiungono precocemente la parte mediana del pavimento orale.

I tumori della base della lingua invece, sono diagnosticati spesso tardivamente sia perché la sede non è facilmente e direttamente esplorabile da parte del medico non specialista, sia perché la sintomatologia iniziale è costituita da una semplice sensazione di corpo estraneo cui spesso non viene attribuita sufficiente importanza.

Quando il tumore si ulcera, insorge dolore spontaneo e alla deglutizione, con irradiazione all'orecchio. Se il volume della massa è cospicuo, oltre a disturbi dell'articolazione della parola e del timbro della voce possono comparire disturbi della deglutizione e, nei casi più avanzati, anche disturbi della respirazione perché il tumore può avere infiltrato anche l'epiglottide oppure, per il suo volume può spostare questa verso il basso e posteriormente, ostruendo la laringe.

Le metastasi linfoghiandolari dei tumori della lingua sono molto frequenti e, non di rado, sono bilaterali o controlaterali, anche se la forma primitiva è monolaterale.

1.5.2. LABBRO

Il carcinoma del labbro è il tumore più frequente del cavo orale e interessa quasi esclusivamente il sesso maschile tra i 50 e gli 80 anni, specie se fumatori di pipa e sigaro. Nella maggior parte dei casi tali tumori originano da lesioni precancerose, come la cheilite attinica e la sede preferenziale di insorgenza è la mucosa del bordo vermiglio inferiore (si tratta quindi di carcinomi squamocellulari). Il tumore si accresce lentamente e data la sua posizione si presta ad una diagnosi precoce e quindi ad un'elevata percentuale di guarigione attuabile con la terapia chirurgica. Si tratta in genere di neoplasie ben differenziate che raramente danno metastasi. Nei casi avanzati il carcinoma labiale metastatizza a livello dei linfonodi sottomentonieri, digastrici e della catena cervicale.

1.5.3. GENGIVA

Il carcinoma delle gengive è spesso osservabile sotto forma ulcerata. La limitata estensione anatomica di questa sede e il coinvolgimento precoce dei tessuti vicini (osso mandibolare), anche in stadi non molto avanzati, rendono sovente difficile individuare la localizzazione di origine della malattia neoplastica, tanto che i tumori di maggiore estensione (T2-T3), che comprendono lesioni di diametro fino a 4 cm, difficilmente rimangono limitati alla sede di origine.

Alcuni Autori sottolineano l'importanza delle lesioni precancerose della gengiva che possono manifestarsi per l'azione dei fattori eziologici comuni (alcool, fumo, protesi dentarie incongrue). Tra le lesioni precancerose più frequenti osserviamo la leucoplachia, con potenzialità di cancerizzazione piuttosto bassa (4-9%) e l'eritroplasia, ad insorgenza più frequente nel fornice gengivale inferiore, caratterizzata da una elevatissima potenzialità di degenerazione.

Il carcinoma della gengiva e del bordo alveolare costituisce un'entità clinica poco frequente, la cui comparsa nelle diverse aree geografiche mostra una notevole variabilità in rapporto a differenti abitudini di vita: la sua massima incidenza si osserva nella VI e VII decade di vita e rappresenta circa il 10% di tutti i tumori del cavo orale. I fattori di rischio che giocano il ruolo predominante nell'insorgenza di tali tumori sono riferibili a quelli già noti per le altre sedi del cavo orale, ossia tabagismo, alcool, scarsa igiene orale e protratto uso di protesi dentarie incongrue. Tra i fumatori risultano più esposti al rischio quelli che fumano la pipa e il sigaro, pur dovendo considerare che in un' elevata percentuale di casi (fino al 50%) la neoplasia si riscontra in pazienti non fumatori e non dediti al consumo di superalcolici. In questi soggetti quindi le flogosi croniche della mucosa orale, le malattie alveolo-dentarie e la presenza di protesi dentarie non idonee rappresentano un fattore eziologico favorente.

1.5.4. TRIGONO RETROMOLARE

Il Trigono retromolare è un'area mal definita ma alquanto ristretta del rivestimento mucoso e delle strutture sottostanti che si trova inserita fra il recesso superiore e quello inferiore degli spazi retrostanti i VII denti (spesso ritenuti o mancanti).

Il carcinoma dello spazio retromolare non è infrequente ed ha tendenza ad infiltrare i tessuti profondi interessando abbastanza precocemente i muscoli pterigoidei. Il suo trattamento è chirurgico e talora comporta il sacrificio oltre che di parte della mandibola anche di parte dell'arcata alveolo-dentaria superiore.

1.5.5. GUANCIA

La prognosi dei tumori maligni della guancia, nonostante i progressi fatti negli ultimi anni dalla chirurgia e in particolare dalla chirurgia ricostruttiva, rimane tra le peggiori del distretto cervico-facciale con una sopravvivenza non superiore a 5 anni per il 36% dei casi e più precisamente fra il 75% e il 60% per gli stadi I e II e fra il 40% e il 25% per gli stadi III e IV. Le recidive loco-regionali che si manifestano fino al 45% dei casi, in relazione allo stadio clinico, sembrano la maggiore causa di morte per i tumori trattati con chirurgia e radioterapia e l'invasione della cute è uno dei più importanti fattori prognostici negativi.

Si tratta per lo più di tumori epiteliali e nel 5% dei casi di tumori ghiandolari insorti su ghiandole salivari accessorie. Sono segnalate anche neoplasie molto più rare in questa sede, come il liposarcoma e i linfomi non Hodgkin. La localizzazione geniena del carcinoma squamoso è poco frequente, tranne in India, dove sembra giocare un ruolo cancerogeno fondamentale l'abitudine locale di masticare foglie di betel. Nei Paesi occidentali le varie casistiche segnalano da 4 a 6 casi per 100.000 abitanti, circa l'1 % dei cancri delle vie aerodigestive superiori e dall'8 al 10% dei tumori maligni del cavo orale.

I tumori della guancia e di tutta la mucosa buccale insorgono su una lesione leucoplasica più spesso che nelle altre sottosedie del cavo orale ed hanno un elevato potenziale metastatico, per via linfatica, con la tendenza ad invadere le strutture profonde. L'unica barriera anatomica alla diffusione tumorale è quella costituita dal muscolo buccinatore, il cui superamento e l'invasione della cute costituiscono uno dei più importanti fattori prognostici negativi.

1.5.6. PAVIMENTO ORALE

Il carcinoma del pavimento della bocca segue come incidenza quello della lingua. La zona più colpita è quella anteriore e adiacente allo sbocco di Wharton. Questo tipo di localizzazione è quasi sempre associata con un forte consumo di bevande alcoliche o di sigarette.

Le lesioni del pavimento orale esordiscono con un aspetto di leucoplachia o eritoplachia che lentamente evolve in ulcerazione. Quando ulcerato il tumore può passare a lungo inosservato, specie se insorgente nel tratto posteriore di tale sede. Sono queste le forme a prognosi peggiore in quanto, oltre ad essere diagnosticate tardivamente, possono precocemente fissarsi e superare il muscolo milo-ioideo, con interessamento della

mandibola e della lingua. In tali casi è generalmente effettuata una chirurgia di tipo demolitivo.

1.5.7. PALATO

I tumori maligni del palato duro rappresentano tra l'1% ed il 5% delle neoplasie maligne del cavo orale e circa lo 0,5% di tutte le neoplasie maligne. I tumori ad origine epiteliale insorgono prevalentemente nell'età adulta, tra la VI e la VII decade e colpiscono più frequentemente il sesso maschile con un rapporto di 5:1. Il carcinoma squamoso è il più frequente dei tumori del cavo orale, ma nel palato duro, la frequenza è inferiore a quella delle neoplasie ad origine ghiandolare con un rapporto che può variare a seconda delle casistiche da 1,5:1 a 3-4:1 a favore di questi ultimi. Stati di irritazione cronica (fumo, alcool, protesi incongrue) e lesioni leucoplasiche e eritroplasiche della fibromucosa palatale sono spesso correlate alla comparsa di tumori del palato duro come per le altre sedi del cavo orale.

Il carcinoma del palato molle non è frequente. Il tumore può interessare solo l'ugola o, estesamente, tutto il velo pendulo fino al palato duro, alla tonsilla o alla faringe. La sintomatologia è legata all'ipomobilità del velo causata dall'infiltrazione neoplastica che condiziona i disturbi della voce e il reflusso attraverso il naso dei liquidi durante la respirazione.

1.6. EZIOPATOGENESI

Attuali evidenze scientifiche, suggeriscono che la transizione da epitelio normale ad epitelio displastico, e successivamente a carcinoma, sia il risultato di una serie di modificazioni modulate sia da fattori ambientali che da alterazioni genetiche ed epigenetiche [7].

1.6.1. FATTORI AMBIENTALI

1.6.1.1. TABACCO

Il fumo di tabacco è una delle cause principali di morte prematura, a livello mondiale. Si stima che circa 4.9 milioni di persone siano morte per cause riconducibili al fumo di sigaretta nel solo anno 2000 e che entro il 2020 il numero potrebbe salire fino a 10 milioni, di cui ben il 70% nei paesi industrializzati [8].

Il tabacco è considerato uno tra i maggiori fattori di rischio per l'insorgenza di cancro orale e faringeo e di altre neoplasie a carico delle prime vie aero-digestive. Il fumo di tabacco contiene più di 60 prodotti di combustione con caratteristiche carcinogeniche, in particolare idrocarburi policiclici aromatici e le nitrosammine tabacco specifiche che si ritrovano principalmente nella fase particolata: 4-(metilnitrosammino)-1-(3-piridil)-1-butanone ed N-nitrososornicotina. Tali sostanze vengono prodotte durante la fase di combustione o endogenamente da alcuni tipi di tabacco senza fumo. Una volta liberati, agiscono localmente sulle cellule staminali dei cheratinociti oppure vengono assorbiti andando a colpire altri tessuti del corpo. Producono addotti del DNA, principalmente la 6-metil guanina in grado di interferire con la replicazione del DNA danneggiando quindi tutte le cellule replicanti dell'organismo comprese quelle del sistema immunitario.

La maggior parte di questi carcinogeni chimici richiede l'attivazione metabolica da parte di enzimi di fase I (citocromo P450 ossidasi quali CYP1A1 e CYP2E1) e la successiva coniugazione ad opera di enzimi di fase II come il glutatione S transferasi (GST) [9]. Polimorfismi a carico di questi geni sono stati precedentemente associati al rischio di cancro a cellule squamose [10,11].

1.6.1.2. ALCOL

Il consumo di alcol è il maggiore problema di sanità pubblica a livello mondiale, con ben 2 miliardi di individui adulti che consumano quotidianamente almeno 13 grammi di etanolo.

L'etanolo e l'acqua sono i principali componenti della maggior parte delle bevande alcoliche. Inoltre, alcuni tipi di bevande alcoliche contengono sostanze additive con potenziale cancerogeno, come l' N-nitrosodimetilammina, presente in alcuni tipi di birra e whisky ed associata ad un incremento di rischio di cancro orale, ed idrocarburi policiclici aromatici ritrovati in alcune tipologie di whisky [12].

I principali enzimi in grado di metabolizzare l'alcol sono le alcol deidrogenasi, in grado di ossidare l'etanolo ad acetaldeide, e successivamente, l'acetaldeide viene convertita in acetato ad opera di deidrogenasi.

Sono state proposte diverse ipotesi che tentano di spiegare come l'etanolo possa rappresentare un rischio potenziale di sviluppare cancro orale, tanto a livello locale quanto a livello sistemico. L'alcol è in grado di promuovere l'oncogenesi con diversi meccanismi [13]; innanzitutto irritando la mucosa orale e danneggiando, localmente, i fosfolipidi delle membrane. Agendo da solvente per i pro-carcinogeni ingeriti con il tabacco, ed aumentando la permeabilità delle membrane stesse, favorisce il passaggio di tali cancerogeni attraverso le membrane [14] e la loro attivazione, andando a stimolare l'attività catabolizzante del fegato.

Essendo molto calorico, provoca inoltre una riduzione dell'appetito e quindi del consumo di cibi dal comprovato potere benefico, quali frutta e verdura. Infine l'etanolo agisce a livello epatico, alterando l'azione di sistemi enzimatici fondamentali alla detossificazione di sostanze cancerogene, quali il glutatione S transferasi ed il sistema del citocromo P450.

Ma dal momento che l'etanolo, *per se*, non è risultato essere carcinogeno, si è indicato il suo primo metabolita, l'acetaldeide (ADH), come principale fattore implicato negli effetti neoplastici delle bevande alcoliche. Tale metabolita, infatti, ha un provato effetto cancerogeno e teratogeno nell'animale e simili effetti sono stati evidenziati anche nell'uomo. Tra le varie azioni, l'acetaldeide interferisce con la sintesi e la riparazione del DNA; inibisce l'attività dell'enzima O⁶-metil-guanintransferasi, coinvolto nei meccanismi riparativi causati da agenti inquinanti; lega proteine e DNA con conseguenti danni morfologici e cellulari e provoca la degradazione *in vitro* dell'acido folico [15,16].

1.6.1.3. DIETA E NUTRIZIONE

Una dieta povera è significativamente associata ad un maggior rischio di comparsa di tumore del distretto testa-collo [17,18]. Uno studio caso-controllo sul cancro della laringe, ha evidenziato come un vario e largo consumo di frutta e verdura conferisca una riduzione nel rischio di comparsa del tumore.

E' ben noto anche quali siano i micronutrienti principalmente coinvolti. La vitamina A ed i relativi carotenoidi (in particolare β -carotene), vitamina C, vitamina E ed il selenio, grazie alla loro potente attività antiossidante, sembrano avere un ruolo da protagonisti nell'azione protettiva nei confronti del tumore epiteliale. Gli antiossidanti, infatti, agiscono riducendo

la quantità di radicali liberi che potrebbero provocare mutazioni a carico del DNA o cambiamenti nella perossidazione lipidica delle membrane. I micronutrienti sono altresì coinvolti nella modulazione del metabolismo dei carcinogeni, nel mantenimento di un corretto differenziamento cellulare, nell'inibizione della proliferazione cellulare e dell'espressione degli oncogeni, nonché nel mantenimento delle corrette funzioni del sistema immunitario e nell'inibizione della formazione di carcinogeni endogeni [19].

1.6.1.4. MICROORGANISMI

Una scarsa igiene orale può rappresentare un rischio indipendente di OSCC. Pazienti affetti da carcinoma del cavo orale presentano spesso altre patologie a carico della bocca, come denti cariati e parodontite. Quest'ultima, in particolare, sembra correlare significativamente con il rischio di cancro di testa e collo, associazione confermata anche in soggetti che non abbiano mai fatto uso di tabacco ed alcool.

I batteri sono stati associati all'eziologia della leucoplachia orale per più di un secolo, cominciando con la classica leucoplachia da glossite sifilitica. Oggi, la sifilide terziaria è una condizione patologica rara, ma il fungo *Candida Albicans*, un comune commensale della bocca, viene frequentemente ritrovato in sezioni istologiche di leucoplachia, prevalentemente a carico dell'epitelio della bocca.

La leucoplachia candidosica è considerata una lesione precancerosa con alta percentuale di trasformazione maligna [20]; tuttavia, l'infezione da *Candida* non è sempre presente in tutte le neoplasie orali, per cui è considerata un fattore aggravante piuttosto che causale.

E' stato suggerito che batteri specifici giochino un ruolo chiave nell'OSCC, ma rimane da chiarire il meccanismo attraverso cui determinino l'insorgenza della neoplasia, forse inducendo la proliferazione cellulare, inibendo l'apoptosi o interferendo con i meccanismi di signaling cellulare [21].

Un meccanismo aggiuntivo è dato dall'aumento nel metabolismo dell'acetaldeide a partire da etanolo [22]. Si conoscono diversi microorganismi in grado di produrre acetaldeide a partire dall'alcool [23] e questo potrebbe spiegare come mai una scarsa igiene orale sia spesso associata a cancro orale in soggetti che abusino di alcool e fumo di sigarette; ovvero la quantità di acetaldeide salivare in tali soggetti, sarebbe molto alta, unitamente alla loro scarsa igiene orale [24].

1.6.1.5. INFEZIONI VIRALI

Tra i possibili virus si ritiene che il Papillomavirus (HPV) giochi un ruolo importante nell'insorgenza dei carcinomi orali. Tale ipotesi sarebbe supportata dall'associazione, già dimostrata, tra questi virus e la neoplasia della cervice uterina che presenta nell'80-90% infezioni da HPV [25,26]. La mucosa della cervice uterina ha una notevole similitudine istologica con la mucosa buccale, sia a livello strutturale della membrana che a livello ultrastrutturale [27]. Ulteriore riprova di tale tesi è la già dimostrata capacità del virus di immortalizzare i cheratinociti umani in vitro [28].

Il carcinoma dell'orofaringe da infezione da HPV sembra correlare maggiormente con il consumo di marijuana e con la pratica del sesso orale piuttosto che con il fumo di sigaretta e l'alcool. I pazienti OSCC HPV positivi, vengono spesso diagnosticati in una fase tardiva e presentano linfonodi cistici nel collo ed una minor differenziazione al microscopio ottico. Nonostante questo, la prognosi di sopravvivenza per questi pazienti sembra essere migliore che nei pazienti HPV negativi [29].

1.6.2. SUSCETTIBILITA' GENETICA

La suscettibilità genetica, o predisposizione, al tumore del cavo orale è una componente importante specialmente nei casi ad insorgenza giovanile, e si basa presumibilmente, come avviene per altri tipi di tumore, sulla trasmissione di difetti a carico di geni coinvolti nei processi di metabolizzazione di carcinogeni, di riparazione del DNA e del controllo del ciclo cellulare.

Diversi studi hanno inoltre riportato l'esistenza di una significativa componente familiare nello sviluppo del cancro orale. La stima del rischio di sviluppare la neoplasia nel caso di parenti di primo grado affetti da cancro orale, varia da 1.1 [30] a 3.8 [31], anche se alcune di queste forme tumorali si riferiscono al distretto di testa e collo in generale. In una piccola percentuale di pazienti affetti da OSCC, è stato inoltre possibile individuare presenza di aggregazione familiare probabilmente con un modello di trasmissione autosomico dominante [32].

Alcuni dati pubblicati tendono a supportare l'esistenza di fattori genetici in grado di aumentare il rischio di insorgenza dei tumori orali. Ad esempio, polimorfismi a carico di geni codificanti enzimi detossificanti (CYP1A1 e GSTM1) sono risultati positivi al test di associazione allelica [33,34].

Polimorfismi candidati sono stati identificati anche in geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare. Ad esempio, uno SNP nel gene CCND1, che codifica per la ciclina D, è risultato associato all'insorgenza del carcinoma del cavo orale.

Il carcinoma a cellule squamose della cavità orale è stato infine associato ad alcune sindromi genetiche come la discheratosi congenita e l'anemia Fanconi. Pazienti affetti da quest'ultima, una patologia autosomica recessiva caratterizzata da anomalie congenite e difetti a carico del midollo osseo, manifestano una certa predisposizione a sviluppare cancro in particolar modo cancro a cellule squamose del cavo orale e delle regioni ano-genitali [35].

Berkower e colleghi nel 1988 [36] hanno altresì osservato una maggior suscettibilità per il carcinoma del cavo orale in pazienti affetti dalla sindrome di Bloom (ritardo della crescita e predisposizione a sviluppare differenti tipi tumori) [37].

1.7. OSCC E PATOGENESI MOLECOLARE

La progressione tumorale da mucosa normale a mucosa displastica ed infine a cancro, è il risultato di una serie di modificazioni geniche che colpiscono le normali funzioni di geni quali proto-oncogeni ed oncosoppressori. Tali alterazioni possono essere in parte ereditate, come abbiamo visto nel paragrafo precedente, ma in maggior parte sono mutazioni che si sviluppano ex novo e si accumulano nel tessuto precanceroso e canceroso. Queste mutazioni possono provocare alterazioni della regolazione del ciclo cellulare, del differenziamento, della proliferazione e della morte cellulare programmata, dei meccanismi di riparazione del DNA e dell'immunità cellulare [32,38,39].

Aberrazioni cromosomiche come delezioni, amplificazioni e riarrangiamenti strutturali, sono frequenti nelle neoplasie e pertanto anche nel cancro di testa e collo.

Sindransky, nel 1995 [40] e Califano e colleghi, l'anno successivo [41], trovarono che una comune alterazione genetica riscontrabile nel tumore a cellule squamose di testa e collo sia la perdita di eterozigosi (LOH) a carico della regione cromosomica 9p21. La perdita di materiale genetico in questa regione, che codifica per gli oncosoppressori p16 e p14^{ARF}, si verifica nel 70-80% nelle lesioni displastiche della mucosa orale.

Anche la perdita di eterozigosi nella regione cromosomica 3p è una comune alterazione genetica che si verifica nelle fasi iniziali della carcinogenesi orale. Tale regione include i geni FHIT e RASSF1A, oncosoppressori che possono essere inattivati sia per delezione genica che per ipermetilazione.

Perdita di materiale genetico in 17p e mutazioni a carico di p53, si verificano invece nelle fasi tardive della progressione da displasia a carcinoma squamoso invasivo.

Per semplicità è possibile classificare i markers tumorali in 5 gruppi, in base alle proprie funzioni biologiche:

- stimolazione della proliferazione e del ciclo cellulare
- soppressione tumorale ed apoptosi
- immortalizzazione
- angiogenesi
- invasione e metastasi.

1.7.1. STIMOLAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE E DEL CICLO CELLULARE

Le cellule normali necessitano della stimolazione da parte dei fattori di crescita esogeni che, mediante il legame a recettori di membrana e la successiva trasduzione del segnale nel compartimento intracellulare, garantiscono la sopravvivenza e la proliferazione cellulare.

Durante la carcinogenesi orale, si può verificare una disregolazione dei meccanismi di controllo di proliferazione che può essere causata da un aumento di espressione dei recettori dei fattori di crescita e/o dei loro ligandi, che siano essi esogeni o riconducibili a stimolazione autocrina [42].

Nella comparsa e progressione del tumore del cavo orale, ad esempio, sembrano giocare un ruolo cruciale l'aumento di espressione del recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR) e del suo ligando Transforming Growth Factor alpha (TGF- α). Gli mRNA di entrambi, risultano infatti rispettivamente overespressi nel 92% e nell'87% dei tumori di testa e collo [43]. La proteina EGFR è risultata superespressa nel 38-47% delle neoplasie a carico del distretto testa collo [44], in particolare nelle forme tumorali a stadio avanzato o poco differenziate. L'incremento della sua espressione, inoltre, sembra correlare alla progressione del carcinoma, da displasia a tumore a cellule squamose [28]. La sovraespressione di EGFR e del suo recettore, è inoltre responsabile dell'aumento di espressione di alcune componenti della famiglia di proteine STAT, coinvolte nel trasferimento dei segnali al nucleo e nella regolazione della trascrizione di geni importanti per la crescita ed il differenziamento cellulare, così come per l'apoptosi. L'attivazione costitutiva di STAT3, ad esempio, provoca un incremento di trascrizione di tali geni con conseguente crescita cellulare incontrollata, risposta anti-apoptotica ed angiogenesi, fenomeni caratteristici di una cellula tumorale [45].

La ciclina D1 è un proto-oncogene in grado di regolare la transizione G1-S del ciclo cellulare e di fungere da cofattore importante per diversi fattori di trascrizione in numerosi

tipi cellulari. L'espressione del gene che la codifica, è risultata aumentata nel 25-70% dei casi di cancro orale [46] ed in una elevata percentuale di lesioni pre-maligne [47]. Questi dati suggeriscono che l'up-regolazione del gene codificante e la sovraespressione della proteina possano essere impiegabili come markers precoci per la carcinogenesi orale.

1.7.2. GENI ONCOSOPPRESSORI ED APOPTOSI

Si conoscono numerose proteine che regolano la morte cellulare programmata (o apoptosi) ed i membri della famiglia Bcl-2 ne sono l'esempio più importante. Appartengono a questo gruppo, almeno 15 proteine differenti sia con funzione anti-apoptotica (Bcl-2, Bcl-X) che pro-apoptotica (Bax, Bak) ed è l'equilibrio fra queste due attività a determinare il destino cellulare. Per quanto riguarda il loro ruolo nelle forme di OSCC, si è osservato un incremento nei livelli di espressione di Bcl-2 e Bcl-X, sia nelle lesioni displastiche che nel cancro orale [48].

p53 è un oncosoppressore coinvolto in diversi meccanismi tra cui la progressione del ciclo cellulare, il differenziamento, la riparazione del DNA e la regolazione del processo apoptotico. E' inoltre uno dei biomarkers del tumore del cavo orale maggiormente studiati. Il gene che la codifica è mutato nel 50% delle forme tumorali, in particolare nel 25-69% dei casi di OSCC [49]. Una'elevata espressione di *p53* è stata osservata nel 40-67% dei casi di carcinoma della testa e collo e tale variabilità è imputabile, oltre all'eterogeneità biologica delle neoplasie, anche a problemi insiti nella metodica. Alcuni autori [50,51] hanno osservato una relazione diretta tra sovra-espressione di *p53* e una prognosi infausta in termini di sopravvivenza. In altri lavori, al contrario, non è emersa una correlazione tra sovraespressione di *p53* e sopravvivenza, mentre è stato evidenziato un importante ruolo di *p53* nel processo di carcinogenesi, come evento precoce della trasformazione maligna, e della progressione istologica del tumore [48,52]. L'espressione di *p53* al di sopra dello strato basale è considerato un evento precoce del processo di carcinogenesi orale ed un indicatore dello sviluppo di un carcinoma, anche prima che compaiano definite alterazioni morfologiche del tessuto.

Anche il pathway di *Rb* (*Retinoblastoma*) gioca un ruolo chiave nella regolazione della progressione del ciclo cellulare e questa attività può essere inibita da specifiche mutazioni. Sebbene mutazioni a carico di *Rb* siano rare nel cancro orale, la sua perdita di espressione è stata riscontrata nel 66% dei casi di OSCC e nel 64% delle lesioni premaligne.

Altro possibile marker di cancro orale è la Survivina, un inibitore del processo apoptotico, espressa in circa l'80% delle forme di carcinoma orale a cellule squamose e la cui espressione correla con un fenotipo aggressivo [53].

1.7.3. IMMORTALIZZAZIONE

Le cellule umane hanno una limitata capacità di auto replicazione e, dopo numerose divisioni cellulari, cessano di crescere ed entrano in senescenza. Le cellule con caratteristiche cancerogene, necessitano di essere immortali per potersi replicare infinitamente e ci riescono mantenendo inalterata la lunghezza dei propri telomeri.

I telomeri sono sequenze di DNA ripetute in tandem, complessate a proteine, localizzate alle estremità dei cromosomi umani con la funzione di proteggerli dalla degradazione [54]. L'attività telomerasica (TA), che mantiene la lunghezza delle ripetizioni grazie all'azione dell'enzima retrotrascrittasi hTERT (Human Telomerase Reverse Transcriptase), è generalmente assente nei tessuti normali ma si registra debolmente nelle lesioni precancerose e nel cancro. Nei tessuti di testa e collo, si osserva TA nelle lesioni precancerose come le leucoplachie, sebbene con un'intensità inferiore che nei tessuti tumorali [55]. In diversi studi si è inoltre osservato che l'incremento di attività di hTERT può considerarsi un evento neoplastico precoce e che un incremento dei suoi livelli di espressione è associabile a prognosi infausta [56].

1.7.4. ANGIOGENESI

Dal momento che la crescita del tumore è limitata ad 1-2 mm³ in assenza di un'adeguata perfusione, i tumori solidi necessitano di una consistente irrorazione sanguigna per poter crescere e metastatizzare [57]. Il fenomeno angiogenetico è il risultato dell'azione contrapposta di segnali pro-angiogenici (vascular endothelial growth factor, VEGF; platelet-derived growth factor, PDGF; ed interleuchina 8, IL-8) ed anti-angiogenici (interferoni e frammenti proteolitici quali angiostatina ed endostatina).

Tra i fattori responsabili dell'angiogenesi tumorale, VEGF è il principale candidato.

Tale proteina stimola l'angiogenesi, inducendo la proliferazione, il differenziamento e la migrazione delle cellule vascolari endoteliali, aumentando la permeabilità capillare e prevenendo l'apoptosi delle cellule endoteliali.

Sebbene diversi studi abbiano correlato l'angiogenesi tumorale alla progressione ed aggressività del cancro orale, i dati in letteratura sono discordanti.

Secondo alcuni studi, l'espressione di VEGF è significativamente maggiore nelle forme avanzate di displasia orale che nelle mucose normali o debolmente displastiche [58], contrariamente a quanto dimostrato da altre ricerche [59]. In una recente meta-analisi, condotta su un totale di 1002 pazienti, di cui il 72% risultava affetto da OSCC, Kyzas e colleghi hanno dimostrato come l'iperespressione di VEGF sia significativamente associata ad una peggior prognosi [60].

1.7.5. INVASIVITÀ E METASTASI

Il cancro orale a cellule squamose è dotato di un'importante capacità invasiva a livello locale e alta predisposizione a metastatizzare a livello dei linfonodi cervicali. Il fenomeno invasivo e metastatico sono il risultato di una serie di processi che coinvolgono l'adesione cellulare, il riarrangiamento citoscheletrico, la migrazione cellulare e la degradazione della membrana basale, il passaggio e la sopravvivenza nel torrente ematico, la capacità di fuoriuscire da questo e colonizzare sedi distanti con formazione di nuovi vasi [36,61]. Si è ipotizzato che questi processi siano associati ad un fenomeno noto come transizione epitelio-mesenchimale (EMT) [62], durante il quale le cellule epiteliali acquistano un fenotipo mesenchimale, dissolvono le giunzioni intercellulari e, perdendo contatto con le cellule confinanti e con la membrana basale divenendo così in grado di migrare, invadere e dare metastasi.

Tra le varie molecole d'interesse, la E-caderina gioca un ruolo chiave nel garantire uno stretto contatto cellula-cellula, in un epitelio orale normale. Una diminuzione della sua espressione è quindi responsabile della perdita di adesione tra le cellule. Per quanto riguarda il suo ruolo nell'OSCC, la perdita o la riduzione di espressione è stata associata a metastasi ai linfonodi ed a diagnosi mortale [63].

Oltre alle caderine, anche le integrine intervengono nel garantire una forte adesione tra cellule e tra cellule e matrice basale [64]. L'analisi immunohistochimica dell'espressione dell'integrina $\alpha_6\beta_4$, ha mostrato come questa proteina di superficie sia associata a metastasi nel tumore del cavo orale [65]. L'espressione della componente $\alpha_v\beta_6$ è risultata up-regolata nella displasia orale ed associata alla degenerazione neoplastica [66].

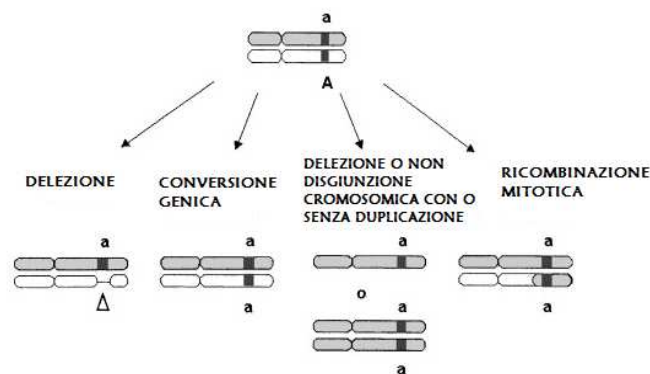
Come anticipato, l'invasione e la disseminazione neoplastica richiedono la proteolisi delle membrane basali e dello stroma interstiziale, ad opera di diversi enzimi tra cui le metallo proteinasi di matrice (MMP). Appartengono a questa famiglia almeno 20 tipi differenti di proteine, la cui espressione a livello dei tessuti colpiti da cancro orale è nota. La proteina MMP2, ad esempio, è considerata un marker predittivo di metastasi del tumore

orale, dal momento che la sua espressione è risultata maggiore nelle cellule metastatiche del collo rispetto alle cellule tumorali non metastatiche [67,68]; mentre, la metalloproteinasi MMP-13 è coinvolta nella metastatizzazione del cancro alla lingua [69].

1.8. PERDITA DI ETEROZIGOSI (LOH) E MICROSATELLITI

Come già accennato, la progressione neoplastica è generalmente caratterizzata da un accumulo di alterazioni genetiche a carico delle cellule somatiche, che compromettono la funzionalità o l'espressione di oncogeni od oncosoppressori. In linea generale, una singola mutazione a carico di un oncogene è sufficiente a promuovere la conversione da fenotipo normale a premaligno, mentre le mutazioni che interessano gli oncosoppressori sono solitamente recessive, per cui una mutazione in uno dei due alleli di un oncosoppressore non è in grado di alterare la crescita cellulare finchè l'altro allele è funzionale. Di conseguenza, per avere un fenotipo mutato, è necessario che entrambi gli alleli del gene siano alterati. La perdita del secondo allele diventa perciò un evento cruciale nella

comparsa della neoplasia. L'importanza degli oncosoppressori, ed in particolar modo, della loro perdita, è rafforzata dall'osservazione che nella maggior parte delle forme tumorali sporadiche ed ereditarie essi sono mutati molto più frequentemente di quanto lo siano gli oncogeni [70]. Secondo il modello



proposto da Knudson, o “*two hits theory*”, generalmente il primo allele è colpito da una mutazione puntiforme seguito dalla perdita dell'allele wild-type che ha come risultato la perdita di eterozigosi (LOH). LOH è la più comune alterazione genetica osservata nei tumori ed è causato da diversi meccanismi, che comprendono la delezione, la ricombinazione mitotica tra alleli omologhi, la conversione genica, la non disgiunzione e la non disgiunzione seguita da duplicazione cromosomica [71,72]. Tuttavia, i primi due modelli ed in particolar modo la perdita di piccole porzioni cromosomiche sono maggiormente associati alla perdita di funzionalità di oncosoppressori [73]. Il principale meccanismo ipotizzato per spiegare tali, è lo “Slippage della DNA polimerasi” che si verifica prevalentemente in particolari regioni contenenti sequenze di DNA ripetuto, quali i microsatelliti. Tale meccanismo consiste in una sorta di slittamento, lungo il filamento copia del DNA, della polimerasi durante la replicazione, con formazione di errori [74]. Alcuni di questi errori vengono corretti dai meccanismi di riparazione ma molti non vengono riparati. Come conseguenza avremo l'aumento o la perdita di materiale genetico. Queste due condizioni, definite rispettivamente MSI ed LOH, si generano da un lato in seguito allo scivolamento sul filamento di DNA e dall'altro da un non perfetto o infallibile meccanismo

di riparazione degli errori e determinano quella che viene definita instabilità genetica dei microsatelliti. I livelli di instabilità risultano notevolmente elevati in alcuni tipi di tumore, ad esempio nel cancro del colon-retto (KK). Nel tumore a cellule piatte di testa e collo, le regioni maggiormente coinvolte in perdita di materiale genetico sono state identificate in 1p, 3p, 4p, 5q, 8p, 9p, 10p, 11q, 13q, 17p, and 18q; mentre in 1q, 3q, 5p, 7q, 8q, 9q, 11q, 12p, 14q, e 15q si sono osservati prevalentemente acquisti di materiale genomico [75].

L'analisi di LOH trova largo impiego nell'indagine di regioni cromosomiche polimorfe che contengano o che si trovino in stretta vicinanza ad oncosoppressori. Tale tecnica vanta un duplice merito: da un lato portare alla scoperta di nuovi oncosoppressori, dall'altro fornire informazioni utili sul ruolo di oncosoppressori presunti, durante lo sviluppo del tumore [41]. Questo tipo di indagine può essere condotta mediante tecniche citogenetiche come l'ibridazione genomica comparativa (CGH) o molecolari come l'analisi di polimorfismi a singolo nucleotide o, come nel nostro caso, di marcatori microsatelliti.

I microsatelliti sono marcatori multiallelici, classificati in base al numero di nucleotidi che costituiscono il *core* ripetuto; per questo motivo si parla, ad esempio, di microsatelliti mono-, di-, tri- e tetra nucleotidici. Il tipo più comune di microsatellite è la ripetizione di- nucleotidica con circa 140.000 copie in tutto il genoma, la metà delle quali rappresentata da sequenze di poli[CA]. Al secondo posto ci sono le ripetizioni di singoli nucleotidi con un totale di 120.000 unità presenti sul genoma.

Ad un determinato locus il numero di ripetizioni è variabile e ogni variante allelica è caratterizzata da un numero specifico di ripetizioni. L'elevato numero di alleli rende ogni micro satellite un polimorfismo ad elevata eterozigosità. Per questi motivi hanno da sempre trovato largo utilizzo negli studi di mappatura genetica ed in campo forense. Negli ultimi anni, tuttavia, l'interesse per questi polimorfismi di lunghezza, si è esteso anche all'oncologia molecolare.

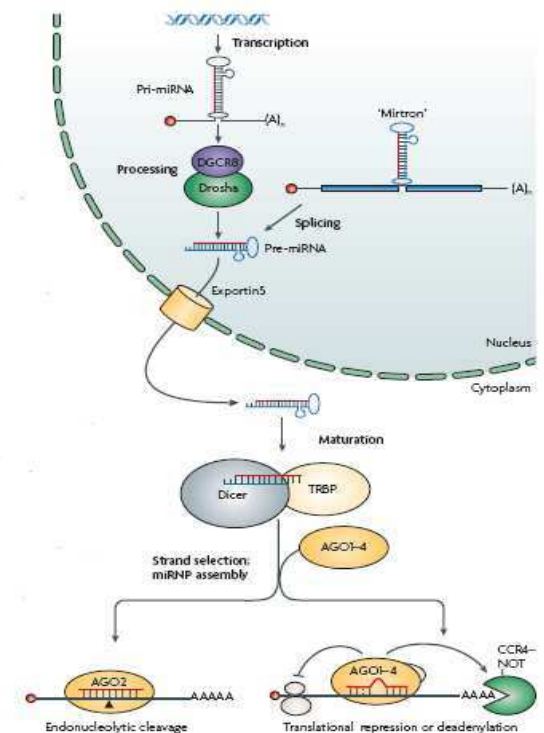
1.9. miRNA

I miRNA costituiscono una famiglia di piccoli RNA endogeni, non codificanti, a singolo filamento, di lunghezza compresa tra i 20 ed i 25 nucleotidi, il cui ruolo fondamentale è quello di regolare negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale. In particolare, i miRNA agiscono mediante il riconoscimento di specifici mRNA target al fine di determinarne la degradazione o la repressione della traduzione. Ad oggi, nell'uomo sono stati identificati circa più di 720 miRNA (<http://www.mirbase.org> – Sanger Institute), e si ritiene che regolino dal 30% al 60% dei geni di tutto il genoma.

Il processo mediante il quale si giunge alla formazione dei miRNA maturi è piuttosto complesso e si compone di diverse tappe che originano nel nucleo e si completano nel citoplasma. La trascrizione dei geni per i miRNA è mediata prevalentemente dalla RNA Polimerasi II (Pol II) [76] e genera il pri-miRNA, una molecola precursore della lunghezza di diverse centinaia di nucleotidi.

Nel nucleo il pri-miRNA si ripiega a formare una struttura a forcina a doppio filamento, spesso contenente la sequenza per miRNA maturi differenti. Questa molecola subisce un clivaggio iniziale, nel nucleo, ad opera di Drosha, una ribonucleasi di tipo III, generando una molecola a forcina di circa 70 nucleotidi, il pre-miR. A questo punto il pre-miR viene esportato dal nucleo al citoplasma ad opera dell'Esportina 5 (Exp5), un trasportatore nucleo/citoplasmatico GTP-dipendente [77].

Una volta all'interno del citoplasma, il pre-miR viene clivato da Dicer con formazione di una piccola molecola di RNA duplex di dimensioni variabili tra 20 e 25 nucleotidi, contenente sia il filamento maturo del miRNA che il suo filamento complementare [78]. Infine il miRNA, dopo essere stato convertito nella forma matura a singolo filamento, grazie all'intervento di un'elicasi, interagisce con le proteine del gruppo Ago, formando il complesso miRISC (miRNA Induced Silencing Complex).



L'appaiamento del miRNA in corrispondenza delle regioni 3'-UTR dell' mRNA target, ne determina la degradazione o l'inibizione della traduzione, regolando in tal modo l'espressione del gene che lo codifica [79].

Dal punto di vista biologico l'importanza di tali molecole si deve al loro coinvolgimento nella modulazione di diversi processi cellulari che comprendono la proliferazione ed il differenziamento, l'apoptosi, la regolazione del ciclo cellulare, la resistenza allo stress ed il metabolismo degli acidi grassi [80-82].

È stato dimostrato che i miRNA possono avere profili di espressione specifici per stadi di sviluppo, tessuti e varie patologie. Studi condotti su diverse forme tumorali, tra cui il cancro della cavità orale, hanno evidenziato un'alterata espressione dei miRNA nel tessuto tumorale rispetto a quello sano, suggerendo il coinvolgimento di tali molecole anche nella carcinogenesi [80-82]. Questa evidenza ha poi permesso di identificare due classi di miRNA associate al cancro, i miRNA che hanno come target geni antiapoptotici e oncosoppressori che promuovono la crescita tumorale ed i miRNA che possono legarsi ad oncogeni svolgendo la funzione di 'tumor suppressor'. Quest'ultima categoria in particolare potrebbe essere di particolare aiuto nello sviluppo di farmaci antitumorali specifici, in grado di mimare la funzione dei miRNA oncosoppressori in vitro.

Per questi motivi, i miRNA possono essere impiegati come biomarkers diagnostici predittivi di tumore.

2. SCOPO DELLA RICERCA

SCOPO DELLA RICERCA

I fattori prognostici di base per il tumore del cavo orale sono la grandezza del tumore e la presenza di metastasi linfonodali o a distanza (classificazione T, N, M). Tuttavia, dal momento che tumori allo stesso stadio e con morfologia simile possono avere un'evoluzione completamente differente a causa delle caratteristiche biologiche intrinseche, questo sistema risulta imperfetto. Per tali motivi, si continuano a ricercare dei marcatori molecolari (biomarkers) che possano essere predittivi della trasformazione neoplastica di una lesione benigna, della progressione tumorale in senso metastatico, o della risposta alle terapie, utilizzando tecniche sempre più sofisticate di immunisto chimica, citologia analitica e biologia molecolare. Un altro campo di sviluppo è quello della genetica molecolare e della genomica.

Le principali e comuni tecniche impiegate prevedono la Reazione a catena della polimerasi (PCR), l'ibridazione in situ (per rilevare amplificazioni geniche o traslocazioni cromosomiche) ed il sequenziamento del DNA. Una particolare applicazione della PCR, permette di determinare l'eventuale perdita di specifiche regioni cromosomiche (Loss of Heterozygosity, LOH) contenenti oncosoppressori noti o presunti.

Anche l'analisi di polimorfismi di singoli nucleotidi (SNPs) a carico di geni implicati nella riparazione del DNA, ha permesso di identificare alcuni potenziali biomarkers.

Recentemente è stata identificata una classe di RNA non codificanti in grado di regolare processi chiave nella cancerogenesi. La variazione di espressione di questi microRNA (miRNA) può essere valutata mediante Northern Blot, Real Time PCR o miRNA microarray.

I microarray rappresentano un potente metodo d'indagine, offrendo la possibilità di studiare i livelli di espressione di migliaia di geni o di tutti i geni di un intero genoma in un singolo esperimento.

Indipendente dalla tecnica impiegata, identificare un "profilo a rischio" di sviluppare cancro o metastasi, permetterebbe non solo di ampliare le conoscenze sulla patologia, ma soprattutto di sviluppare degli approcci terapeutici personalizzati che possano garantire al paziente la guarigione con l'approccio terapeutico meno invasivo.

Partendo da evidenze pubblicate e da dati preliminari ottenuti da ricercatori nel nostro gruppo di ricerca mi sono dedicata all'identificazione di biomarkers del carcinoma a cellule piatte del cavo orale utilizzando due diverse strategie. Ho voluto verificare il possibile ruolo di riarrangiamenti cromosomici specifici, cercando di correlare la perdita di eterozigotità a livello di sette geni, con diversi parametri clinici. Inoltre ho voluto valutare il coinvolgimento dei microRNA nella progressione in senso metastatico utilizzando prima un

metodo massivo per valutare le variazioni di espressione di tutti i microRNA conosciuti e successivamente il ruolo di un polimorfismo funzionale nel gene di uno specifico microRNA.

3. MATERIALI

3.1. CAMPIONI DI STUDIO

3.1.1. CAMPIONE PER L'ANALISI DI PERDITA DI ETEROZIGOSI (LOH)

I tessuti utilizzati derivano da resezioni chirurgiche di 51 pazienti Italiani, con un'età compresa tra i 55 ed i 74 anni, che hanno dato il proprio consenso affinché le biopsie fossero usate per scopi di ricerca.

La diagnosi di carcinoma a cellule squamose e la raccolta dei tessuti è stata effettuata presso l'Istituto di Patologia dell'Università Politecnica delle Marche, tra il 2003 ed il 2007. I pazienti sono risultati affetti da OSCC, secondo la classificazione proposta dall'Unione Internazionale Contro il Cancro, codice ICD-O-C02-C06, che esclude le forme tumorali a carico di tonsille e laringe (Tabella. III).

I tessuti patologici erano distribuiti in 7 sedi: 17 tumori della lingua, 9 del pavimento della bocca, 9 della mandibola, 6 tumori della mascella, 7 del labbro, 2 del palato ed uno retromolare. Nessuno dei pazienti presentava metastasi a distanza (Mo) e tutti sono risultati negativi al test per la presenza del virus del Papilloma Umano ad alto rischio [83]. La classificazione istopatologia dei tumori è descritta in Tab. III.

	N0	N1	N3	N3
T1	9	3	2	-
T2	16	6	8	-
T3	1	1	3	-
T4	1	-	1	-

Tabella. III. Classificazione dei campioni secondo il linguaggio TNM proposto dall' UICC (Unione Internazionale Contro il Cancro).

Per ciascun paziente è stato raccolto un campione tissutale sano ed un campione con un contenuto di cellule tumorali superiore al 75%. Parte del materiale è stata congelata in azoto liquido subito dopo l'intervento chirurgico, e conservata a -80 °C fino all'estrazione del DNA genomico, la rimanente parte è stata utilizzata per le analisi istopatologiche.

3.1.2. CAMPIONE PER L'ANALISI DI ESPRESSIONE DEI miRNA

Per questa parte dell'indagine abbiamo utilizzato i tessuti tumorali di 15 pazienti Italiani, che hanno dato il proprio consenso affinché le biopsie fossero usate per scopi di ricerca. Come campioni di riferimento abbiamo utilizzato un pool di 11 biopsie appartenenti ad individui sani, come confermato dall'analisi istologica dei tessuti prelevati.

Tutti i campioni, tumorali e controlli, sono risultati negativi al test per la presenza del virus del Papilloma Umano ad alto rischio [83] e la loro raccolta è avvenuta come descritto al paragrafo 3.1.1. I tessuti patologici includevano 7 tumori metastatici (MT) ed 8 tumori senza metastasi (TWM).

Nella tabella IV sono riassunte le caratteristiche cliniche e patologiche dei pazienti coinvolti nello studio.

Tessuto normale di mucosa orale di 11 volontari non affetti da OSCC è stato utilizzato per creare un pool da utilizzare come riferimento per valutare l'espressione relativa dei miRNA di ogni campione tumorale.

SESSO	ETA'	SEDE	GRADO	T	N	M	TERAPIA
F	58	Gengiva mascellare	2	2	0	0	S
M	83	Gengiva mandibolare	1	2	0	0	S+ND
M	75	Gengiva mascellare	2	1	0	0	S
M	49	Pavimento orale	3	2	0	0	S+ND
F	73	Gengiva mascellare	2	2	0	0	S
M	76	Gengiva mandibolare	3	2	0	0	S+ND
M	61	Gengiva mandibolare	2	2	0	0	S+ND
M	74	Cuancia	3	2	0	0	S
M	76	Lingua	3	2	1	0	S+ND
M	70	Gengiva mandibolare	3	2	2c	0	S+ND+R
M	55	Lingua	3	3	1	0	S+ND+R
M	93	Lingua	2	2	1	0	S+ND
M	51	Lingua	2	1	1	0	S+ND
F	80	Gengiva mandibolare	3	1	1	0	S+ND
M	39	Lingua	3	1	2b	0	S+ND+R

Tabella IV. Caratteristiche cliniche e patologiche dei pazienti affetti da OSCC, secondo la classificazione UICC. **S**= surgery on primary tumor; **ND**= neck dissection; **R**=radiotherapy

3.1.3. CAMPIONE PER L'ANALISI DEL POLIMORFISMO rs2910164

Il campione utilizzato in questa terza parte del mio progetto di Dottorato, è rappresentato da DNA proveniente da tessuto tumorale di 360 pazienti affetti da tumore a cellule squamose del cavo orale. In questo gruppo sono inclusi i campioni descritti al paragrafo 3.1 ed altri ottenuti da frammenti inclusi in paraffina.

Come campione di riferimento, abbiamo utilizzato dati di popolazione normale disponibili in letteratura o in banche dati pubbliche. In particolare, sono stati utilizzati i genotipi raccolti e pubblicati da Catucci e colleghi [84](88) nella popolazione tedesca, e quelli consultabili sul sito del progetto HapMap (<http://www.hapmap.org/index.html.en>), per quanto riguarda la popolazione "Toscani in Italia" (TSI).

3.2. ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO DA TESSUTI FRESCHI

Per l'estrazione del DNA genomico da campioni congelati, circa 25 mg di tessuto sono stati dapprima disgregati con un dismembratore meccanico e successivamente incubati a 56°C per almeno 2 ore, in 200µl di buffer di lisi e proteinasi K. Dopo inattivazione della proteinasi K, avvenuta a 70°C per 10 minuti, si sono aggiustate le condizioni di binding mediante aggiunta di 200 µl di Etanolo Assoluto. Il lisato totale è stato caricato nelle colonne per il legame del DNA alla membrana silicea, e centrifugato a 11.000 rpm per 1 minuto. Il DNA ancorato alla membrana, è stato lavato con un tampone di lavaggio ed infine eluito con un buffer di eluizione. La quantità di DNA ottenuto per ciascun campione era compresa tra i 5 ed i 15 µg.

3.3. ESTRAZIONE DEL DNA DA TESSUTI INCLUSI IN PARAFFINA

Per i campioni tissutali inclusi in paraffina l'estrazione del DNA genomico è avuta partendo da sezioni di 12 µm di spessore. Le sezioni sono state immerse in Xilene per un'ora, al fine di rimuovere la paraffina e successivamente centrifugate a 13,500 rpm. Dopo il lavaggio con etanolo assoluto, i tessuti sono stati incubati over-night a 56°C, in 200 µl di soluzione di lisi (Nucleospin Tissue, Macherey-Nagel) e proteinasi K (1mg/ml) fino alla loro completa disgregazione. Successivamente abbiamo inattivato la proteinasi K a 70°C per 10min e centrifugato il lisato a 12,000 g per 5 minuti per eliminare i frammenti di membrana cellulare. Successivamente, il DNA così ottenuto, è stato purificato con l'ausilio del Nucleospin Tissue DNA kit (Macherey-Nagel) secondo le modalità riportate nel protocollo.

3.4. PROGETTAZIONE DEI PRIMER E AMPLIFICAZIONE IN PCR

Per l'amplificazione dei microsatelliti mediante PCR è necessario disegnare dei primer fiancheggiati la sequenza d'interesse. Una buona coppia di primer deve possedere alcuni requisiti essenziali:

- i singoli oligonucleotidi dovrebbero essere lunghi circa 20 paia di basi (pb), per assicurare specificità.
- Non devono avere lunghe ripetizioni dello stesso nucleotide, che potrebbero provocare lo slittamento del primer.
- Dovrebbero avere una sequenza piuttosto omogenea, con una percentuale in citosine e guanine simile a quella del template.

- E' da evitare la presenza di sequenze complementari all'interno dei primer, che porterebbero alla formazione di strutture "a forcina" (hairpin); escludendo l'oligonucleotide dalla reazione.
- Non devono essere presenti regioni di complementarietà in 3' tra gli oligonucleotidi per evitare la formazione di dimeri di primer.

Negli ultimi anni, la fase di progettazione è stata velocizzata grazie all'impiego di programmi informatici. Il programma utilizzato per i nostri scopi si chiama Primer3 ed è liberamente fruibile interfacciandosi al sito http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi. Per ottenere delle sequenze oligonucleotidiche, è sufficiente inserire la sequenza del template, il range di lunghezza desiderato per entrambi gli oligonucleotidi (massima e minima), la temperatura ideale di melting (T_m) e la massima differenza di T_m tra i primer senso e antisenso e la lunghezza dell'amplificato.

I primer sono stati progettati e marcati con fluorocromi in modo da poter ottenere numerose letture in ogni corsa elettroforetica al sequenziatore automatico, evitando cioè la sovrapposizione di amplificati con le stesse dimensioni e marcati con il medesimo fluorocromo.

Le caratteristiche dei primers, specifici per ciascun polimorfismo indagato, sono riassunti nella tabella V.

Ho eseguito l'amplificazione in un volume totale di $12.5 \mu\text{l}$ contenente $0.05 \mu\text{g}$ di DNA genomico, 1X di PCR buffer, 1.5 mM di dNTPs, 10 pmoli di ciascun primers, 1.5 mM di MgCl_2 e 0.5 Unità di RedTaq polimerasi.

GENE	MARKER	BANDA	SEQUENZE PRIMERS E SONDE	RANGE (bp)	DYE
PDCD4	D10S543	16q22.1	5'- GAT GTT CAG GTA GAT AAC ACACAC-3' FW	122-138	NED
			5'- CAC TCC CCA GAA GGG AAT TT -3' REV		
	D10S1682	5'- TCC TCC TTA ATC CTC TCT CCA A -3' FW			
		5'- TCA GTT TAT AGA GGC ACA AAA TCA -3' REV			
CASP4	D11S2000	11q22.3	5'- CCT CCT AGG TTT ACA TCT ATC TCA AAT -3' FW	146-182	FAM
			5'- CTG TGA AAT GTG CCA GTT AGC-3' REV		
	D11S4951		5'- AGC TGA AGG TGT ATG AGC TTC ATT AT-3' FW		
			5'- GAT TTT AAA AGA TAA TGA CAA CTT CC-3' REV		
CDH3	D16S3025	16q22.1	5'- CCA TGC TTA AAT CTG TCC CTT C-3' FW	77-97	HEX
			5'- GGG AGC TGA GAG ACA TCT GG-3' REV		
	D16S496	5'- CAG TTA ACA GTT CCC TGG GTT T-3' FW			
		5'- CGC CCA TCC TCC ACT ATC TA -3' REV			
CTNNB1	D3S2407	3p22.1	5'- AAA GCA GTC TTT CTT TGT TTT GC -3' FW	119-137	FAM
			5'- TGG AGC AAG ACC CTT TCT CTA AT -3' REV		
	D3S3527	5'- TGT TTA CAG AAC ATT TCA CCC AAC -3' FW			
		5'- TGG TCT GAG AAG ATA CTT GAT TGT A -3' REV			
HSP27	D7S2518	7q11.23	5'- ACA AGC AAA AGA AAA ATC CCA TA -3' FW	102-122	FAM
			5'- TCC ATG CCT TGT GTG TGT G -3' REV		
	D7S2470	5'- CCA GTG GCA AAT GGT TGC -3' FW			
		5'- CCA GGT ATG AAT CCT TCA CTT TT -3' REV			
BCL2	GATA175B10	18q21.33	5'- TCT CCC ACC CCT AAT ATA TGG A -3' FW	150-172	FAM
			5'- CCC ACT ATA TGT ATG TTC ACC ATT -3' REV		
	D18S1147		5'- GGT GAC TAA TGC CCA GTT TTA TAG -3' FW		
			5'- GGA CTG GGA ACA TGG CTC T -3' REV		
P53	D17S960	17p13.1	5'- GTG ACT CAA ACC CCA ACA GG 3' - FW	204-232	NED
			5'- ACT CTT CTG GCA CAG GGT GT 3' - REV		
	D17S1353	5'- GCA CGA GAA TTG CAC CAC T 3' - FW			
		5'- ACC GCA GCT GAG GGA TAC TA 3'-REV			

Tabella V. Caratteristiche dei primers utilizzati nell'indagine di perdita di eterozigosità. Sono riportate le sequenze nucleotidiche e la marcatura di ciascun primer, la regione cromosomica indagata e la lunghezza dell'amplificato ottenuto.

3.5. ELETTROFORESI IN GEL D'AGAROSIO

Per visualizzare la riuscita della reazione di PCR i prodotti di amplificazione eseguiti sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio. Per visualizzare i diversi amplificati, di una lunghezza variabile compresa tra le 70 e le 240 pb, sono stati allestiti gel alla concentrazione del 2%, utilizzando come tampone di corsa e per risospendere la polvere, una soluzione di Tris-Acetato EDTA 0.5X (TAE). Dopo la corsa realizzata ad un voltaggio costante di 80V si visualizza il gel al transilluminatore.

Le bande corrispondenti ai frammenti di DNA amplificati in PCR sono rese visibili grazie alla presenza nel gel di Syber Green (1 μ l in 50 ml di TAE 0.5X), un colorante fluorescente che si intercala tra le basi del DNA e ne permette la visualizzazione, se eccitato con una sorgente luminosa adeguata (UV).

Questa procedura ci ha permesso di stimare la concentrazione di ciascuna amplificato per poterlo diluire adeguatamente prima del caricamento al sequenziatore automatico. Il caricamento degli amplificati in quantità omogenee favorisce una corretta misurazione dell'area di ciascun picco, necessaria per il calcolo dell'indice di LOH.

3.6. ELETTROFORESI CAPILLARE

La valutazione della lunghezza degli amplificati, e quindi del genotipo dei loci microsatteliti, è stata effettuata mediante corsa elettroforetica col sequenziatore automatico ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, usando capillari in silice fusa, lunghi circa 47cm, con un diametro interno di 50 μ m e riempiti di un polimero (POP4, Applied Biosystem) in grado di separare gli amplificati in base alle loro dimensioni.

Il funzionamento è il seguente: ciascun campione viene messo a contatto con un elettrodo catodico e con l'estremità di un capillare contenente il polimero. All'altra estremità del capillare troviamo un elettrodo anodico, immerso in un tampone salino appropriato (Genetic Analyzer Buffer with EDTA, Applied Biosystem).

I campioni, amplificati e quantificati in gel d'agarosio, sono stati opportunamente diluiti in acqua distillata deionizzata e ad 1 μ l di ciascuno sono stati aggiunti 11.5 μ l di formamide e 0.5 μ l di size-standard marcato (Rox GS350, Applied Biosystem). Una volta denaturati, alla temperatura di 95°C per 4 minuti, sono stati posti immediatamente in ghiaccio in attesa del caricamento al sequenziatore automatico. L'ingresso del campione nel capillare avviene per iniezione elettrocinetica, applicando una differenza di potenziale tra la vial contenente il prodotto di PCR e quella dell'estremità opposta del capillare, pari a 15kV

per 1-10 sec. Successivamente, anche l'estremità del capillare vicina all'estremo catodico viene immersa nel buffer salino. Il passaggio di corrente tra i due poli, mantenuto costante a 15 kV, garantisce così l'instaurarsi di un ciclo elettroforetico della durata di 23 minuti per ciascun campione.

Questa metodica può rilevare solo amplificati marcati con un fluorocromo dato che nel capillare è presente una finestra attraverso la quale un laser è in grado di eccitare il fluoroforo permettendo, così, l'emissione e la rilevazione di un segnale. Questa tecnologia permette di discriminare amplificati marcati con fluorocromi diversi anche se sono della stessa lunghezza. L'insieme delle sequenze, processate dal software GenScan (Applied Biosystem) e visualizzate in un unico grafico caratterizzato da una successione di picchi di colori diversi e corrispondenti alle emissioni fluorescenti dei vari fluoro cromi costituisce un elettroferogramma.

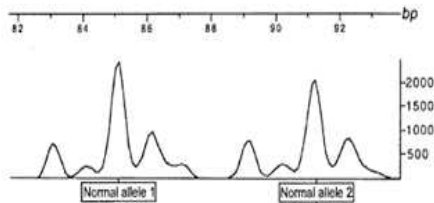
Il software di analisi GeneScan (AppliedB Biosystem) per minimizzare la variabilità tra le corse elettroforetiche, utilizza il marcatore molecolare aggiunto a ciascun campione per creare una retta di taratura basata sulla velocità di migrazione dei vari frammenti a dimensioni note. Il software è successivamente in grado di estrapolare le dimensioni degli amplificati di ogni campione. Per ciascun campione è inoltre in grado di fornire i dati relativi all'ampiezza e all'altezza dei picchi; quest'ultimo dato verrà utilizzato per valutare l'eventuale perdita di materiale genomico.



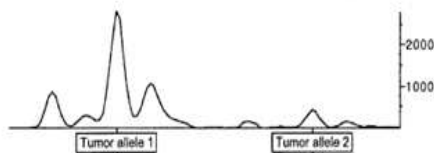
Figura I. Elettroferogramma. Lungo l'asse delle ascisse sono riportate le dimensioni dei frammenti (bp) mentre in ordinata l'intensità del segnale espressa come RFU (Relative Fluorescence Units)

3.7. ANALISI LOH

Dal momento che nell'indagine LOH difficilmente si ha la perdita completa di un allele, per contaminazione da parte dei tessuti normali al momento della biopsia e/o come conseguenza di un'eterogeneità genetica all'interno del tumore stesso, la perdita di



$$\text{LOH index} = \frac{\text{Tumor allele 1} / \text{Tumor allele 2}}{\text{Normal allele 1} / \text{Normal allele 2}}$$



eterozigosi per ciascuna coppia di tessuto tumorale/sano, è stata valutata utilizzando il metodo descritto da Cawkwell [85](79). Secondo tale criterio, l'indice LOH è un valore definito dal rapporto tra l'altezza del picco dell'allele minore e quella dell'allele maggiore, nel campione tumorale rispetto al corrispondente campione normale.

I valori di LOH inferiori od uguali a 0.67 ed superiori od uguali ad 1.5 sono stati considerati indicativi di LOH e si traducono in una riduzione del 33% nell'altezza del picco di uno degli alleli tumorali rispetto al corrispondente allele normale. In linea generale, un valore di $\text{LOH} \leq 0.67$ indica la perdita dell'allele più corto, mentre si ha perdita dell'allele di maggiori dimensioni per $\text{LOH index} \geq 1.5$.

3.8. PROFILO DI ESPRESSIONE DI miRNA

I metodi di biologia molecolare tradizionali per valutare i livelli di espressione genica consentono lo studio di uno o pochi geni alla volta non permettendo di avere una visione d'insieme dell'evento biologico, come invece sarebbe utile nel caso di malattie complesse come i tumori. L'ibridazione di microarray è potente mezzo d'indagine, il cui potere risiede nella capacità di studiare i livelli di espressione di migliaia di geni o di tutti i geni di un intero genoma in un singolo esperimento.

La tecnica dei microarray si basa sul principio dell'ibridazione complementare tra molecole target e sonde ancorate ad un vetrino e prevede diverse tappe, che comprendono :

- estrazione dell'RNA,
- marcatura,
- ibridazione di vetrini
- lettura delle fluorescenze mediante scanner

Circa 50-100 mg di tessuto di ciascun campione sono stati omogeneizzati, mediante apposito omogeneizzatore, in 1 ml di Trizol (Invitrogen) ed incubati a temperatura ambiente per 5 minuti. In seguito all'aggiunta di 200 μ l di cloroformio e centrifugazione a 12000g per 15 minuti, l'omogeneizzato si è separato in due fasi: una fase organica contenente DNA e proteine ed una fase acquosa superiore contenente l'RNA.

La fase acquosa è stata trasferita in un nuovo tubo a cui sono stati aggiunti 200 μ l di Etanolo 100% per la successiva estrazione dei miRNA. Per l'isolamento e la purificazione dei miRNA abbiamo utilizzato un kit di estrazione (PureLink™ miRNA Isolation Kit, Invitrogen) che, mediante il passaggio su apposite colonnine è in grado di trattenere le molecole di RNA di piccole dimensioni (miRNA, tRNA, rRNA).

Per la marcatura dei miRNA e l'ibridazione dei vetrini miRNA-microarray (NCode™ Multi-Species miRNA Microarray, Invitrogen), contenenti 329 sequenze di miRNA umani in duplicato, abbiamo utilizzato circa 400ng di miRNA estratti da ciascun campione tumorale e dal pool di campioni di controllo. Inizialmente, a ciascun miRNA è stata aggiunta una coda poly(A) all'estremità 3', grazie all'azione dell'enzima poly A polimerasi. Successivamente, è avvenuta una reazione di ligazione in cui una "capture sequence" si è legata alla coda poly A mediante una sequenza ponte di oligo(dT). Le sequenze utilizzate per i campioni tumorali differivano da quelle dei campioni sani, differenza necessaria per poter distinguere le due tipologie di campione.

Per poter distinguere i segnali dei campioni tumorali da quelli dei campioni di riferimento abbiamo marcato i rispettivi miRNA modificati con due fluorofori differenti in grado di legarsi alla specifica "capture sequence".

Seguendo la convenzione, i miRNA dei campioni tumorali sono stati marcati con Alexa Fluor® 5 (che assorbe a 650 nm ed emette a 665 nm) mentre quelli estratti dai controlli, sono stati legati ad Alexa Fluor® 3 (che assorbe a 556 nm ed emette a 573 nm). La marcatura è avvenuta incubando la miscela di ibridazione contenente i due fluorocromi a 62 °C per circa 4 ore.

Dopo aver purificato i miRNA modificati, ne abbiamo favorito l'ibridazione ai vetrini miRNA microarray mediante incubazione a 52 °C per circa 18-20 ore. I vetrini sono stati quindi lavati con soluzioni saline e detergenti, per eliminare i miRNA non ibridati, ed infine, asciugati mediante centrifugazione a 2000 rpm per 2 minuti.

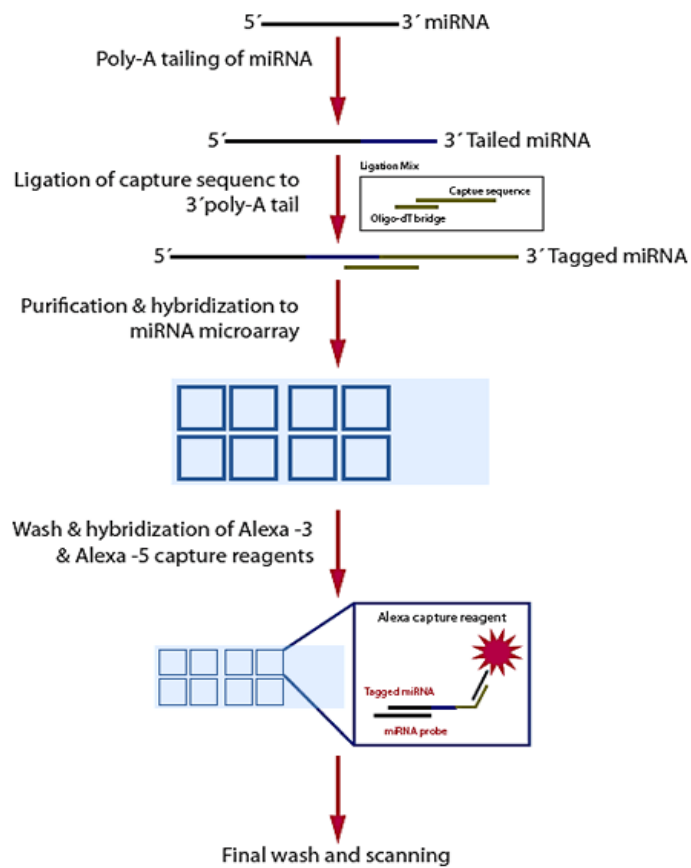


Figura II. Fasi principali dell'allestimento dei microarray per miRNA.

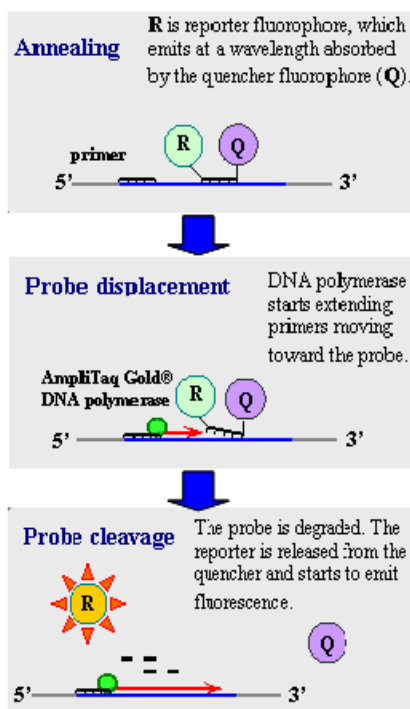
Successivamente, i microarray sono stati sottoposti a scansione laser per valutare la fluorescenza di ogni punto di ibridazione utilizzando lo scanner Genepix 4000A (Axon Instruments). Infine le scansioni sono state analizzate mediante il software GENEPIX Pro 6.0.

3.9. ANALISI DEI GENOTIPI DI POLIMORFISMI A SINGOLO NUCLEOTIDE

I polimorfismi di singoli nucleotidi (SNP) sono marcatori bi-allelici (presentano cioè solo due varianti alleliche) che prevedono la sostituzione di una base azotata con un'altra (transizioni, transversioni), ma anche le delezioni e le inserzioni di basi singole sono considerate variazioni comuni. Dati recenti indicano che esistono più di dieci milioni di possibili SNP in tutto il genoma umano (circa uno SNP ogni 300 basi) ed è quindi considerato essere il marcatore genetico più frequente.

La discriminazione allelica, è stata valutata utilizzando per il locus di interesse una coppia di primer ed una coppia di sonde marcate con due differenti fluorocromi (FAM e VIC). Le reazioni di PCR sono state allestite in una miscela di 10 µl contenente 1 µl di DNA genomico, 5 µl di 2X TaqMan Universal PCR Master Mix e 0,2 µl di 40X SNP Genotyping Assay Mix (specifico per ciascun polimorfismo). Le amplificazioni sono state realizzate utilizzando lo strumento Sequence Detection System ABI PRISM 7500 ed il metodo basato sull'idrolisi della sonda TaqMan, secondo il protocollo fornito dalla ditta Applied Biosystems.

In questo tipo di test una sonda oligonucleotidica è introdotta nella miscela di



reazione per rilevare l'amplificazione di una specifica sequenza di DNA bersaglio. La sonda porta legate alle estremità 5' e 3', rispettivamente, una molecola Reporter (R), ed un Quencher (Q), sufficientemente ravvicinate da far sì che la fluorescenza emessa da R venga assorbita direttamente da Q a causa del fenomeno di trasferimento di energia di risonanza (FRET). Nel corso della reazione di PCR la sonda fluorescente si appaia per complementarità al filamento bersaglio e, durante l'estensione viene degradata dall'attività esonucleasica della DNA polimerasi. L'allontanamento reciproco di reporter e quencher determina un conseguente emissione di fluorescenza.

Al termine della reazione di amplificazione la fluorescenza emessa da ciascun campione è scomposta nelle due componenti FAM e VIC, ed il genotipo è determinato dalla loro differenza (ΔRn). In particolare, il prevalere di una componente fluorescente sull'altra è conseguenza della presenza di un genotipo omozigote, mentre la rilevazione di entrambe è legata alla presenza di entrambi gli alleli.

4. METODI STATISTICI

4.1. FISHER EXACT TEST

Il test delle probabilità esatte di Fisher, proposto per la prima volta quasi contemporaneamente e in modo indipendente negli anni 1934-35 anche da Yates ed Irwin, è un test statistico non parametrico.

Fondato sulla distribuzione ipergeometrica, che utilizza il calcolo combinatorio, è usato per verificare se i dati dicotomici di due campioni riassunti in una [tabella di contingenza](#) 2x2 siano compatibili con l'[ipotesi nulla](#) (H_0) che le popolazioni di origine dei due campioni abbiano la stessa suddivisione dicotomica e che le differenze osservate con i dati campionari siano dovute semplicemente al caso.

In una tabella 2x2 si pongono nelle righe i campioni (o fattori sperimentali), nelle colonne la presenza (+) o assenza (-) di un dato carattere.

	Risposta X	Risposta x	Totale
Campione Y	a	B	$n_1 = a + b$
Campione y	c	D	$n_2 = c + d$
Totale	$n_3 = a + c$	$n_4 = a + d$	$N = a + b + c + d$

Ronald Fisher dimostrò, basandosi sulla funzione densità della v.a. ipergeometrica, che la probabilità di ottenere i valori in tabella si ricava dalla formula:

$$P_i = \frac{C_{a+c}^a \cdot C_{b+d}^b}{C_N^{a+b}} = \frac{\frac{(a+c)!}{a!c!} \cdot \frac{(b+d)!}{b!d!}}{\frac{N!}{(a+b)!(c+d)!}} = \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{a!b!c!d!N!}$$

che, intuitivamente, si può abbreviare nel seguente modo:

$$P_i = \frac{n_1! \cdot n_2! \cdot n_3! \cdot n_4!}{a! \cdot b! \cdot c! \cdot d! \cdot N!}$$

Questa formula dà le probabilità esatte di osservare i valori a, b, c, d (dati $a+b, a+c, c+d, b+d$) qualora fosse vera l'ipotesi nulla sopra enunciata.

Con questa formula, la probabilità (P_i) di trovare quel particolare insieme dei dati osservati è determinata dal rapporto tra il prodotto dei fattoriali dei quattro totali marginali ed il prodotto dei fattoriali delle quattro frequenze osservate moltiplicato il numero totale di osservazioni.

Il metodo di Fisher si fonda sul concetto che, tenendo fissi i totali, i numeri riportati nelle 4 caselle possano assumere per caso qualsiasi valore. Sulla base di questo presupposto, si può calcolare la probabilità di ottenere ognuna delle risposte possibili. Per stabilire se esiste una differenza significativa tra le due distribuzioni osservate dei campioni Y e y , non è sufficiente calcolare la probabilità della distribuzione osservata.

Come con la precedente distribuzione binomiale, nel caso di metodi esatti si deve stimare la probabilità totale di osservare una combinazione di dati così estrema oppure più estrema. A questo fine, si riduce di 1 il numero di osservazioni nella casella con il numero minore, modificando i valori delle altre caselle per mantenere uguali i totali marginali; successivamente, si calcola la probabilità di ottenere ognuna di queste risposte. E' necessario elencare tutte le possibili combinazioni delle osservazioni più estreme e quindi calcolare le probabilità esatte associate ad ognuna di queste possibili combinazioni dei dati.

4.2. EQUILIBRIO DI HARDY-WEINBERG

Una popolazione è in equilibrio di Hardy-Weinberg quando le frequenze alleliche e quelle genotipiche non subiscono variazioni da una generazione a quella successiva.

Queste condizioni vengono soddisfatte quando la popolazione:

- è *panmitica*, ovvero c'è incrocio casuale tra individui, quindi assortimento casuale dei gameti;
- è *infinita* o, comunque, molto ampia;
- è costituita da individui appartenenti a una specie *diploide*, a *riproduzione sessuale* e con *generazioni separate*;
- in essa sono assenti fenomeni di *migrazione*, di *mutazione* e di *selezione naturale*

Il rispetto di tutte queste condizioni risulta molto difficile, in quanto l'accoppiamento è influenzato da vari fattori come, ad esempio, la vicinanza geografica o fattori culturali; non esistono, inoltre, popolazioni infinite e molte di esse sono a generazioni sovrapposte: ne è un esempio la specie umana. Inoltre, i fenomeni di mutazione e selezione sono necessari per garantire la variabilità genetica della popolazione e la sua evoluzione.

Il principio di Hardy-Weinberg, per un locus biallelico L (A,a), può essere espresso dalla seguente equazione:

$$(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

Con:

p e q = frequenze alleliche

p^2 = frequenza genotipica dell'omozigote AA

$2pq$ = frequenza genotipica dell'eterozigote Aa

q^2 = frequenza genotipica dell'omozigote aa.

Il principio di Hardy-Weinberg, che può essere applicato anche a loci con tre o più alleli, verrà espresso, in questo caso, dal quadrato di un polinomio, con tanti termini quanti sono gli alleli al locus considerato.

Per verificare se la popolazione in esame è in equilibrio di Hardy-Weinberg, viene utilizzato il test statistico del χ^2 ; espresso dalla seguente formula:

$$\chi^2_{[g.l.]} = \sum (O_i - A_i)^2 / A_i$$

dove O_i è la frequenza osservata nella classe i-esima e A_i è la frequenza attesa nella classe i-esima in base all'ipotesi formulata. I gradi di libertà (g.l.) si calcolano sottraendo una

unità al numero di classi in cui è diviso il campione; sottraendo un ulteriore grado di libertà per ognuno dei parametri stimati per il calcolo del χ^2 .

Il χ^2 ottenuto dall'analisi dei dati sperimentali, viene confrontato con i valori tabulati, ai quali corrispondono determinate probabilità; nella tabella del χ^2 , per un solo grado di libertà, il valore di 3.841 corrisponde alla soglia di significatività del 5%, pertanto un valore di χ^2 uguale o maggiore di 3.841 può essere osservato, per effetto di deviazioni casuali, solo il 5% delle volte.

4.3. TEST DEL CHI² DI INDIPENDENZA

Supponiamo di avere due serie di dati di tipo qualitativo (per esempio categorie A e B) raccolte in condizioni diverse (tempo 1 e tempo 2). Le due serie, associate in una tabella di contingenza 2 X 2, potranno essere confrontate tramite il Chi² di indipendenza. Il test per la verifica dell'ipotesi di indipendenza ci consente di stabilire se le distribuzioni delle frequenze per la variabile colonna, in una tabella di contingenza, sono indipendenti dalla variabile riga e viceversa. In tale procedura si assume che un campione sia estratto da un'unica popolazione e che tutti gli elementi del campione siano assegnati esattamente ad una determinata modalità riga e ad una modalità colonna. L'ipotesi nulla è che le due variabili siano indipendenti, quella alternativa è che siano dipendenti.

Una delle applicazioni di questo test statistico consiste nel verificare se esiste un'associazione tra un determinato polimorfismo ed una patologia. In questo lavoro vengono confrontate due categorie di osservazioni (gruppo di casi, cioè pazienti affetti da OSCC e gruppo di controllo, ovvero individui sani) e le due possibili varianti alleliche per quel determinato SNP. Si può, pertanto, costruire una tabella 2 X 2, come la seguente:

ALLELI	CASO	CONTROLLO	TOTALE
1	a	b	a+b=R ₁
2	c	d	c+d=R ₂
TOTALE	a+c=C ₁	b+d=C ₂	a+b+c+d=N

Dove 'a' è la frequenza osservata per l'allele 1, nei casi; 'b' è la frequenza osservata per l'allele 1, nei controlli; 'c' è la frequenza osservata per l'allele 2, negli affetti; 'd' è la frequenza osservata per l'allele 2, negli individui non affetti.

Il valore del χ^2 ha un grado di libertà ed assume il valore di:

$$\chi^2 = \frac{(|ad-bc| - 1/2 N)^2 N}{(a+b)(a+c)(c+d)(b+d)}$$

Il valore del χ^2 di indipendenza indica se debba essere accettata o rifiutata l'ipotesi di indipendenza tra le due classi considerate; se il χ^2 è significativo, è probabile che esista un'associazione tra polimorfismo allelico e la condizione in cui sono stati osservati i due gruppi di dati; ci fornisce la probabilità che la differenza tra quanto da noi osservato e quanto atteso secondo la legge di Hardy-Weinberg, sia dovuto al caso.

4.4. RAPPORTO CROCIATO DI RISCHIO: ODD RATIO

Negli studi volti a verificare l'esistenza di un'associazione statistica tra un determinato polimorfismo e lo stato di salute /malattia, si possono formulare due diverse ipotesi:

- a) che vi sia associazione tra un determinato allele o un determinato genotipo con la patologia in esame;
- b) che non vi sia associazione tra le due variabili.

Le misure per quantificare l'entità di tale associazione sono numerose e le più utilizzate sono il rapporto di prevalenza, il Rischio Relativo e l'Odd Ratio.

La misura statistica, comunque, più utilizzata in genetica epidemiologica è il "rapporto incrociato" o "odd ratio" (O.R.). Il termine "odd" può essere tradotto come "probabilità a favore"; l'odd, in pratica, corrisponde al rapporto fra il numero di volte in cui l'evento si verifica o si è verificato, ed il numero di volte in cui l'evento non si verifica o non si è verificato.

Negli studi caso-controllo, che cercano di verificare l'esistenza di un'associazione statistica tra un determinato polimorfismo e lo stato di salute/malattia, si possono formulare due diverse ipotesi, cioè che vi sia associazione tra un determinato allele o un determinato genotipo con la patologia in esame, oppure che non vi sia associazione tra le due variabili.

In relazione ai dati 'R' ottenuti, verrà accettata l'ipotesi più verosimile; per verosimiglianza di un'ipotesi (H) si intende la probabilità 'p' di ottenere quei dati osservati 'R', se è vera l'ipotesi 'H', quindi: $p(R|H)$.

Per valutare p viene applicato il test dell'Odd Ratio (O.R.), che può essere espresso come il rapporto tra la verosimiglianza dell'ipotesi H_i e la verosimiglianza dell'ipotesi alternativa H_{non-i} , cioè che la prima ipotesi sia sbagliata:

$$Odd = H_i/H_{non-i}$$

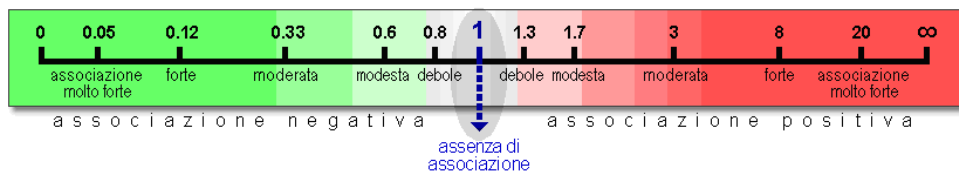
Nella presente analisi, quindi, l'O.R. viene calcolato sui dati sperimentali, utilizzando la formula:

$$Odds\ ratio = \frac{a/b}{c/d} = \frac{a}{b} * \frac{d}{c} = \frac{ad}{bc}$$

dove

	si malattia	no malattia
si esposizione	a	b
no esposizione	c	d

L'Odd Ratio può assumere valori tra zero e l'infinito: un valore minore dell'unità indica un'associazione negativa, pertanto l'allele è 'protettivo' nei confronti della patologia; se il test assume il valore di uno, troviamo la stessa proporzione dell'allele tra gli individui sani e malati; quindi il polimorfismo è 'indipendente' dalla patologia. Un valore maggiore di uno indica un'associazione tra l'allele e la malattia ovvero, esso aumenta il 'rischio' dell'insorgenza della patologia. In altri termini l'associazione è tanto più elevata quanto più il valore dell'O.R. è grande.



Schema di interpretazione dei valori di Rischio Relativo ed Odd Ratio.

4.5. ANALISI DEI MICROARRAY

Le immagini ricavate dalla scansione dei vetrini vengono, analizzate mediante il software GENEPIX Pro 6.0 della Axon Instruments. L'analisi si articola in diverse fasi successive, precisamente:

- acquisizione dei valori di intensità per entrambe le sonde utilizzate
- correzione del segnale ottenuto rispetto al rumore di fondo e la successiva normalizzazione dei valori ottenuti
- studio dei profili di espressione, che comprende:
 1. individuazione dei geni differenzialmente espressi
 2. indagine del ruolo funzionale dei geni significativamente deregolati.

Gli spot che non hanno dato nessun segnale o che hanno mostrato difetti evidenti sono stati esclusi dall'analisi.

Per ottenere l'intensità netta della fluorescenza si sottrae il segnale di fondo ai valori di intensità ottenuti per ciascun miRNA analizzato.

Un altro passaggio molto importante è la riduzione della variabilità di segnale dovuta a cause sperimentali piuttosto che biologiche. A questo scopo il software utilizza la regressione lineare locale "lowess" per calcolare il valore soglia della validità del segnale, elabora la correzione del background, normalizza i dati con i metodi Z-score e normalizzazione globale e infine, calcola per ogni spot il rapporto espresso come logaritmo (base 2) fra le intensità del segnale dei due canali dando un grafico come quello di figura .

Per selezionare le sequenze significativamente deregolate tra i gruppi di campioni analizzati (tumore vs controllo; campioni metastatici vs campioni non metastatici), abbiamo utilizzato il programma SAM (Significance Analysis of Microarray), che identifica i geni statisticamente significativi effettuando un *t*-test specifico [86].

In questo metodo si utilizzano permutazioni ripetute dei dati per determinare se la variazione di espressione di ogni gene sia significativa. L'impiego di metodi di analisi basati sulle permutazioni, permette di tenere conto della correlazione tra geni ed evitare le assunzioni parametriche circa la distribuzione dei singoli geni, dal momento che i dati potrebbero non seguire una distribuzione normale.

Nello specifico, a ciascun gene indagato viene assegnato un punteggio che tiene conto di quanto, la sua espressione, si discosta dalla deviazione standard di misurazioni ripetute per quello stesso gene. I geni con un punteggio superiore ad un determinato valore soglia, vengono considerati potenzialmente significativi. Il cut-off per la significatività, è stabilito dal parametro delta (Δ), scelto dall'operatore sulla base del False Discovery Rate

(FDR), ovvero la percentuale di geni identificati come differenzialmente espressi per pure fluttuazioni.

Per stimare il FDR, fissato il Δ , si definiscono due valori soglia, pari al minimo dMi tra i geni significativamente espressi e il massimo dmi tra quelli significativamente repressi. Si conta quindi, per ogni permutazione casuale, il numero di geni per cui si ha di $> dMi$ o di $< dmi$. Mediando su tutte le permutazioni si ha il numero stimato di geni falsamente significativi. In altre parole, questo valore permette di dare una valutazione statistica dell'affidabilità con cui si è individuato l'insieme di geni differenzialmente espressi.

L'analisi con il metodo SAM può essere condotta in modi differenti, in base alla tipologia dei dati con cui lavoriamo. E' possibile infatti condurre un'analisi ad una classe se le espressioni geniche medie si discostano dallo zero, o un'analisi a due classi quando abbiamo due gruppi di misurazioni. In particolare, si parla di analisi a due classi *paired* o *unpaired* quando le unità misura sono rispettivamente, identiche o meno, tra i due gruppi analizzati.

A questo punto, le tabelle di espressione vengono analizzate mediante TreeViewer, (<http://gepas.bioinfo.cnio.es/cgi-bin/treeview>) un'applicazione che permette di raggruppare in cluster i geni il cui profilo di espressione è simile (geni coespressi). L'assunzione di base in una clusterizzazione di questo tipo è che geni con profili di espressione analoghi siano coinvolti nelle stesse funzioni cellulari o appartengano allo stesso pathway regolatorio.

Questo approccio rappresenta il modo più semplice ed immediato per avere un'informazione primitiva circa la funziona del nuovo gene.

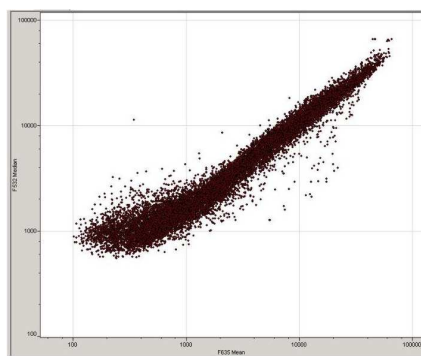


Figura II - Grafico in scala logaritmica (base 2) dei rapporti fra le intensità del segnale della fluorescenza nei due canali (Alexa Fluor®5/ Alexa Fluor®3) per ogni spot.

Per valutare la variazione del profilo di espressione di diversi miRNA nei campioni tumorali rispetto ai controlli, abbiamo condotto un'analisi SAM ad una classe, fissando come valore

soglia di significatività un Δ pari a 0.78, con FDR di 0.001. Nel confronto tra casi metastatici rispetto ai non metastatici abbiamo invece eseguito un'analisi a due classi, ponendo a 0.29 il cut off di significatività, con un FDR pari a 0.001. In entrambi i casi abbiamo condotto l'analisi su 1000 permutazioni.

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1. ANALISI DELLA PERDITA DELL' ETEROZIGOSITA' (LOH)

5.1.1. PREMESSA

Con l'obiettivo di identificare nuovi geni associati al cancro e nuovi marcatori molecolari in grado di definire la progressione delle lesioni premaligne e la metastatizzazione del tumore, i membri del nostro gruppo di ricerca hanno comparato il profilo di espressione di diversi geni, nel tumore a cellule squamose a carico della lingua, a diversi stadi di differenziamento (displasia, metastasi e non)[87,88].

Tra i vari geni analizzati tramite cDNA microarray, quelli codificanti quattro proteine apoptotiche PDCD4, CASP4, HSP27 e CDH3 hanno manifestato un pattern di espressione differenziale nelle forme metastatiche rispetto alle non metastatiche.

Per supportare questi dati e confermare il ruolo di tali geni nella progressione tumorale, ho condotto un'indagine di LOH su un campione di 51 pazienti italiani. Oltre ai geni sopracitati, ho incluso nello studio altri 3 geni, noti oncosoppressori ma la cui funzione nel tumore del cavo orale non è ancora molto chiara: B-cell lymphoma protein 2(BCL2), catenin-beta-1 (CTNB1) e tumor protein p53 (TP53) [88]. I polimorfismi indagati, due per ciascun gene, sono i seguenti: D10S1682 e D10S597 per PDCD4, D11S4951 e D11S2000 per CASP4, D16S3025 e D16S3067 per CDH3, D3S2407 e D3S3527 per CTNB1, D7S2518 e D7S2470 per HSP27, GATA175B10 e D18S1147 per BCL2, D17S960 e D17S1353 per TP53.

Per la scelta dei marcatori ho consultato il sito USCS (<http://genome.ucsc.edu>) che fornisce le caratteristiche di tutti i polimorfismi documentati ed ho preso in considerazione i microsatelliti maggiormente polimorfi ed eterozigoti, minimizzando la probabilità di incorrere in loci omozigoti non utili per rilevare la LOH.

5.1.2. RISULTATI

Tutti i 14 marcatori microsatelliti scelti per l'indagine hanno confermato il buon livello di informatività, con un'eterozigosità compresa tra il 65 ed il 98%. Il confronto tra i genotipi del tessuto tumorale e del tessuto non tumorale dello stesso paziente ha rivelato un alto livello di riarrangiamenti cromosomici ai siti analizzati. Infatti, dei 51 tumori analizzati, il 53% ha mostrato LOH in almeno un marcatore.

Guardando la tabella VI, in cui sono riportate le percentuali di LOH riscontrate ad ogni marcatore e i valori combinati per ciascun locus indagato, è possibile avere un'idea sull'importanza che ciascun gene, e una perdita di materiale genico a suo carico, potrebbero avere nell'insorgenza della patologia e nella sua progressione.

I geni maggiormente colpiti da LOH sono quelli codificanti la beta-catenina 1 (CTNB1), la caspasi 4 (CASP4), la proteina tumorale p53 (TP53) e la proteina del linfoma a cellule B (BCL2). In queste regioni cromosomiche, infatti, la perdita di materiale genetico in uno dei due cromatidi fratelli è risultata pari al 18, 20, 29 e 20%, rispettivamente.

MARKER <i>GENE</i>	n.i. ^a (Het.) ^b	LOH (%)
D3S2407	41 (0.80)	7 (17)
D3S3527	41 (0.80)	7 (17)
<i>CTNB1</i>	<i>50 (0.98)</i>	<i>9 (18)</i>
D7S2518	48 (0.94)	4 (8)
D7S470	45 (0.88)	2 (4)
<i>HSP27</i>	<i>50 (0.98)</i>	<i>4 (8)</i>
D10S597	33 (0.65)	4 (12)
D10S1682	36 (0.71)	5 (13)
<i>PDCD4</i>	<i>47 (0.92)</i>	<i>5 (10)</i>
D11S2000	45 (0.88)	8 (17)
D11S4951	37 (0.73)	9 (24)
<i>CASP4</i>	<i>50 (0.98)</i>	<i>10 (20)</i>
D16S3025	36 (0.71)	6 (16)
D16S3067	45 (0.88)	3 (6)
<i>CDH3</i>	<i>48 (0.94)</i>	<i>7 (14)</i>
D17S1353	40 (0.78)	12 (30)
D17S906	33 (0.65)	11 (33)
<i>TP53</i>	<i>44 (0.86)</i>	<i>13 (29)</i>
GATA175B10	41 (0.80)	9 (22)
D18S1147	47 (0.92)	8 (17)
<i>BCL2</i>	<i>49 (0.96)</i>	<i>10 (20)</i>

Tab VI. Risultati dell'indagine di perdita di eterozigosi, su 51 campioni affetti da OSCC.

n.i.^a = numero di campioni informativi; (Het.)^b = Eterozigosità

Per valutare l'esistenza di una correlazione tra i risultati molecolari ed i dati clinici, abbiamo organizzato i dati in una tabella, distribuendo in maniera ordinale crescente, la

severità della patologia ed il numero di LOH riscontrate (Tab. VII). Al fine di ridurre il numero di categorie previste dalla classificazione TNM, abbiamo adottato il sistema di raggruppamento proposto dall'International Union Against Cancer (UICC) e riportato in tabella VII.

RAGGRUPPAMENTO DELLA STADIAZIONE TNM						
I	T ₁ N ₀					
II	T ₂ N ₀					
III	T ₁ N ₁	T ₂ N ₂	T ₃ N ₀	T ₃ N ₁		
IVa	T ₁ N ₂	T ₂ N ₂	T ₃ N ₂	T ₄ N ₀	T ₄ N ₁	T ₄ N ₂

Tabella VII. Raggruppamento della stadiazione TNM sulla base della classificazione proposta dall'UICC.

Come si può osservare nella tabella VIII, il numero di geni coinvolti dalla perdita di un allele, aumenta progressivamente all'aumentare della severità del tumore. Questa ipotesi è stata confermata dall'analisi statistica, eseguita con il test di Sommers, dalla quale è risultata significativa la correlazione tra il numero di geni colpiti da LOH (per uno od entrambi i marcatori) e la gravità della manifestazione tumorale ($p=0.03$).

UICC	N° LOH/GENE							TOT
	0	1	2	3	4	5	6	
I	7	2	-	-	-	-	-	9
II	8	2	5	1	-	-	-	16
III	4	2	1	2	1	-	1	11
IVa	6	4	2	1	-	1	1	15
TOT	25	10	8	4	1	1	2	51

Tabella VIII. Numero di LOH osservati, nei 7 loci indagati, stratificati sulla base della stadiazione UICC.

I dati sono poi stati scorporati per valutare il peso della perdita di eterozigosi a carico di ciascun gene in relazione alla gravità del tumore. Nella tabella IX sono riportati il numero di

tumori osservati ad ogni stadio UICC separando i risultati a seconda della positività o meno alla perdita di eterozigotità. Ad esempio si può verificare che i 5 casi di tumori con LOH al gene PDCD4 erano tutti ad alto grado di gravità (stadi III o IV). L'analisi statistica indica che l'LOH non è casualmente distribuita tra i diversi stadi di gravità, infatti l'LOH a carico dei geni PDCD4 ($P=0.02$), CTNB1 ($P=0.03$) e CASP4 ($P=0.04$) è significativamente più frequente nei casi più gravi (tabella IX).

	LOH NEGATIVO				LOH POSITIVO				<i>P value</i>
	I	II	III	IVa	I	II	III	IVa	
CTNN1	9	14	8	10	-	2	3	4	0.03
HSP27	9	14	10	13	-	2	1	1	0.73
PDCD4	8	16	8	10	-	-	2	3	0.02
CASP4	9	13	7	11	-	2	4	4	0.04
CDH3	9	13	9	10	-	3	1	3	0.22
TP53	6	11	3	10	1	3	6	4	0.28
BCL2	9	12	8	11	1	3	3	3	0.51

Tabella IX. Distribuzione delle perdite di eterozigosi, per singolo gene, stratificate sulla base della stadiazione UICC.

Su 24 campioni con metastasi a carico dei linfonodi laterocervicali (N1 ed N2), il 54% ha mostrato perdita di eterozigosi in almeno uno dei marcatori utilizzati, ma l'analisi statistica non ha mostrato alcuna associazione significativa tra i loci indagati e la presenza di metastasi linfonodali (Tabella X).

	LOH NEGATIVO		LOH POSITIVO		<i>P value</i>
	No	N1	No	N1	
CTNN1	23	18	4	5	0.715
HSP27	24	22	3	1	0.614
PDCD4	24	18	2	3	0.644
CASP4	22	18	4	6	0.490
CDH3	23	18	4	3	1.000
TP53	18	22	6	8	0.342
BCL2	21	18	5	5	1.000

Tabella X. Distribuzione delle perdite di eterozigosi, per singolo gene, stratificate per la presenza (N1) o meno (NO) di metastasi linfonodali.

Per quanto riguarda invece il possibile coinvolgimento di questo riarrangiamento cromosomico nella ricomparsa del tumore, solo il gene HSP27 è risultato essere marginalmente correlato ($p=0.05$) (Tabella XI). Su 13 pazienti caratterizzati da ricomparsa del tumore dopo l'intervento chirurgico, abbiamo infatti osservato 3 perdite alleliche a carico di questo gene, ed una sola tra i pazienti senza recidiva. Il rischio relativo è risultato pari ad 11, con un intervallo di confidenza al 95% di 1.01-115.

	LOH NEGATIVO		LOH POSITIVO		<i>P value</i>
	Recidiva +	Recidiva -	Recidiva +	Recidiva -	
CTNN1	30	11	6	3	0.697
HSP27	36	10	1	3	0.049
PDCD4	30	12	3	2	0.472
CASP4	30	10	6	4	0.436
CDH3	31	10	4	3	0.278
TP53	24	6	8	6	0.152
BCL2	30	9	7	3	0.690

Tabella XI. Distribuzione delle perdite di eterozigosi, per singolo gene, stratificate per la presenza o meno di recidiva

5.1.3. DISCUSSIONE

La perdita di eterozigosità è tra le più comuni alterazioni molecolari osservate nei tumori solidi dell'uomo e la sua analisi è considerata uno strumento utile sia per valutare perdite di materiale genico a carico di geni oncosoppressori noti, sia per identificarne di nuovi.

In questa parte del progetto di Dottorato, mi sono dedicata alla ricerca di potenziali marcatori utili nella prognosi tumorale e nel monitoraggio della progressione metastatica, verificando l'eventuale associazione tra la perdita di materiale genico a carico di 7 loci specifici ed i dati clinici di 51 pazienti affetti da OSCC.

E' stata osservata una correlazione positiva tra la severità delle manifestazioni cliniche ed il numero di loci colpiti da LOH ($p=0.03$). Questo ci permette di affermare che la perdita di eterozigosi è un meccanismo importante nella progressione del cancro orale a cellule squamose e che il progressivo accumulo di lesioni geniche, nei loci presi in esame, è riscontrabile all'aumentare dello stadio di gravità tumorale.

In tre dei sette loci analizzati, precisamente PDCD4 (P value= 0.02), CTNB1 (P value= 0.03) e CASP4 (P value= 0.04), il numero di perdite di eterozigosità è risultato correlare positivamente con la stadiazione proposta dall'UICC.

La proteina HSP27, invece, è risultata associata alla ricomparsa del tumore dopo l'intervento chirurgico di rimozione (P value= 0.049), sottolineando il fatto che la perdita di eterozigosità al locus HSP27 è un indice che rivela un' aumentata probabilità di comparsa di recidive. Se confermato, questo dato avrebbe un'elevata importanza clinica. Infatti, il paziente operato di un tumore con LOH in HSP27 andrebbe seguito e monitorato con maggior frequenza per favorire una diagnosi precoce di recidiva.

La proteina nucleare PDCD4 è stata inizialmente associata al fenomeno apoptotico, ma la sua attività biologica è stata successivamente studiata in maniera più approfondita e le è stato riconosciuto il ruolo principale di oncosoppressore, in grado di inibire la trasformazione neoplastica e la progressione tumorale intesa sia come invasività che capacità metastatizzante [89,90]. Studi recenti hanno indicato che PDCD4 è coinvolta nei meccanismi di trascrizione, traduzione e trasmissione del segnale [90]. E' noto inoltre che l'espressione di PDCD4 aumenta durante l'apoptosi, mentre riduzioni nella sua espressione si sono osservate in diversi tipi di tumori solidi tra cui quello pancreatico [9], epatico [91], esofageo [92], polmonare [93] ed ovarico [94]. In questi due ultimi casi, la riduzione dell'espressione di PDCD4 è risultata correlare positivamente con la severità della patologia e la negatività della prognosi. Uno dei meccanismi proposti per spiegare la down regolazione di PDCD4, vede questo gene come bersaglio del miRNA21 (miR-21). A favore

di questa teoria, infatti, vi è l'osservazione dell'esistenza di una correlazione inversa tra i livelli di espressione di PDCD4 e quelli del miR-21, in diversi tipi di tumore.

In uno studio condotto precedentemente nel nostro laboratorio è stata riscontrata una deregolazione dell'espressione di PDCD4 nel cancro orale a cellule squamose, in particolare, la sua espressione è risultata significativamente ridotta nei casi con metastasi a distanza, rispetto ai campioni che presentavano solo il tumore primario [88]. Per questo motivo abbiamo deciso di includere il gene per la proteina PDCD4 nell'indagine di perdita di eterozigosità. I risultati ottenuti confermano il ruolo di PDCD4 nella progressione del cancro orale a cellule piatte, ed indicano che la perdita di eterozigosità è uno dei meccanismi che potenzia l'aggressività del tumore sia in termini di invasività che di comparsa di metastasi.

I nostri risultati hanno evidenziato che anche la perdita allelica a carico del gene della beta catenina 1 (CTNB1) correla significativamente con gli stadi più aggressivi dell'OSCC, rendendola un marcatore utile per migliorare la classificazione del tumore del cavo orale. La beta catenina è una proteina multifunzionale che gioca un ruolo cruciale nel garantire sia l'adesione cellula-cellula, grazie all'interazione con caderine ed altre proteine di membrana, sia la trasduzione del segnale cellulare, attraverso il pathway Wnt [95]. La via di trasduzione del segnale Wnt è di fondamentale importanza nel garantire la proliferazione, il differenziamento delle cellule e la transizione epitelio mesenchimale [96]. Risulta facile capire come, una riduzione nei segnali della beta catenina sia stata associata all'acquisizione di un fenotipo invasivo, in diverse forme tumorali tra cui il cancro orale [97].

La proteina CASP4 appartiene alla famiglia delle caspasi, cistein-proteasi cellulari essenziali nell'attuazione dell'apoptosi e della risposta infiammatoria [98]. La capacità di sfuggire alla morte cellulare programmata, nonostante l'accumulo di danni a carico del DNA, è una caratteristica tipica delle cellule tumorali [39] che, unitamente alla perdita sul controllo della replicazione, favorisce l'espansione clonale e la crescita del tumore. Numerose evidenze supportano l'ipotesi che mutazioni somatiche in geni codificanti proteine pro-apototiche, tra cui diversi membri della famiglia delle *caspasi*, siano coinvolte nella comparsa di alcuni tipi di tumore [99-102]. La proteina CASP4, è risultata significativamente sottoespressa nei tumori metastatici del cavo orale, rispetto ai non metastatici [88], motivo per cui è stata inclusa in questa indagine. Il gene della CASP4 è risultato positivo al test dell'LOH nel 20% dei tessuti tumorali analizzati, ed in particolare ha manifestato una frequenza significativamente maggiore negli stadi tumorali più avanzati. Sebbene si tratti di un risultato interessante, rimangono ancora aspetti importanti da

chiarire. Infatti, il gene CASP4 mappa in un cluster che include anche i geni CASP1, CASP5 e CASP16. Ulteriori indagini, con l'analisi di un numero maggiore di micro satelliti sarebbero necessarie per distinguere l'effetto di ogni singolo gene sul fenotipo tumorale.

Tra i vari loci inclusi nell'indagine, solo quello codificante la proteina HSP27 si è mostrato, seppur marginalmente, correlabile alla ricomparsa del tumore dopo l'intervento. Il nostro interesse per questa proteina, nasce da risultati recenti che la indicano come possibile marcatore tumorale di OSCC. In un lavoro del 2006, infatti, Lo Muzio e colleghi hanno ottenuto una correlazione significativa tra la riduzione dell'espressione di questa proteina ed una prognosi sfavorevole. Vista la scarsità di informazioni presenti in letteratura, abbiamo deciso di utilizzare la tecnica dell'LOH per capire se la causa della regolazione dell'espressione di questa proteina potesse risiedere nella delezione cromosomica. La frequenza di eterozigosi nel locus di HSP27 è risultata pari all'8%, con una frequenza maggiore (23%) tra i pazienti in cui il tumore era ricomparso, confermando la nostra ipotesi.

Infine, contrariamente a quanto ci si portebbe attendere, è interessante notare come la perdita di eterozigotità a carico del gene per la p53, pur essendo un fenomeno relativamente frequente (32%), non risulti correlato nè alla stadiazione, nè alla comparsa di metastasi linfonodali o di recidive. Questi risultati, che confermano quanto ottenuto da Rosin in un precedente lavoro, suggeriscono che la perdita allelica nel locus p53 è un evento comune negli stadi precoci del tumore del cavo orale ma non è possibile considerarla un marcatore di progressione tumorale.

5.2. ANALISI DI ESPRESSIONE DI miRNA TRAMITE MICROARRAY

5.2.1. BACKGROUND SCIENTIFICO

Dal punto di vista biologico l'importanza dei miRNA si deve al loro coinvolgimento nella modulazione di diversi processi cellulari che comprendono la proliferazione ed il differenziamento, l'apoptosi, la regolazione del ciclo cellulare, la resistenza allo stress ed il metabolismo degli acidi grassi [80-82].

È stato dimostrato che i miRNA possono avere profili di espressione specifici per stadi di sviluppo, tessuti e varie patologie. Studi condotti su diverse forme tumorali, hanno evidenziato un'alterata espressione dei miRNA nel tessuto tumorale rispetto a quello sano, suggerendo il possibile coinvolgimento di tali molecole anche nella carcinogenesi [80-82].

Questa evidenza ha poi permesso di identificare due classi di miRNA associate al cancro, i miRNA che hanno come target geni oncosoppressori che promuovono la crescita tumorale ed i miRNA che possono legarsi ad oncogeni svolgendo la funzione di 'tumor suppressor'. Quest'ultima categoria potrebbe essere di aiuto nello sviluppo di farmaci antitumorali specifici, in grado di mimare la funzione dei miRNA oncosoppressori in vitro.

I risultati ottenuti da alcuni gruppi di ricerca, che confermano il diretto coinvolgimento di questa nuova classe di molecole in diversi tipi di tumore, la mancanza di dati in letteratura circa la loro funzione nel cancro orale, e la necessità di comprenderne maggiormente le funzioni e definirne il ruolo nello sviluppo e nella progressione tumorale, ci hanno spinto ad indagare sul possibile ruolo dei miRNA nel cancro orale a cellule squamose. A questo scopo, abbiamo confrontato il profilo di espressione di 329 miRNA umani in 15 pazienti affetti da OSCC ed 11 pazienti sani. Tra i campioni tumorali, 7 presentavano metastasi linfonodali, permettendoci così di valutare l'effetto dei miRNA non solo nella comparsa del tumore (campioni sani vs. campioni tumorali) ma anche nella progressione metastatica (campioni metastatici vs. campioni non metastatici).

5.2.2. RISULTATI

I dati ottenuti con il saggio di ibridazione dei microarray, sono stati analizzati con il software statistico SAM, che mediante un *t test* ha evidenziato i miRNA differenzialmente espressi (campioni tumorali vs. controlli sani e campioni metastatici vs. campioni non metastatici), considerando significativi i valori di FDR < 0.001.

Comparando i profili di espressione genica di 15 campioni tumorali con un pool di 11 campioni sani, è emerso che l'espressione di 19 miRNA è significativamente alterata nei tumori. Tra questi, 13 miRNA (miR-489, miR-129, miR-23a, miR-214, miR-23b, miR-92, miR-25, miR-210, miR-212, miR-515-3, miR-146b, miR-21 ed il miR-338) sono risultati sovra-espressi nei campioni tumorali rispetto ai controlli sani mentre 6 miRNA (miR-520h, miR-197, miR-378, miR-135b, miR-224 ed il miR-34a) hanno subito una riduzione della loro espressione nei pazienti con OSCC (tabella XII).

La comparazione dei profili d'espressione di 7 tumori metastatici con quelli di 8 tumori senza metastasi al fine di seguire le tappe di cancerizzazione del tumore ha evidenziato un piccolo numero di miRNA deregolati (tabella XIII).

Nei campioni con metastasi, i mir-155, let-7i e mir146a hanno mostrato una riduzione significativa della loro espressione (livelli di espressione tra il 36% e il 55% di quelli riscontrati nei tumori non metastatici). L'espressione di questi 3 miRNA è risultata aumentata nei tumorali senza metastasi, rispetto ai controlli sani, mentre è diminuita nelle forme metastatiche, con una derepressione di let-7i e mir-146a ed un ritorno ai valori basali per il miRNA-155.

miRNA	SAM Score(d)	Chr. Band
UP REGULATED miRNA		
hsa-miR-489	3.51	7q21.3
hsa-miR-129	3.50	7q32.1
hsa-miR-23a	3.40	19p13.13
hsa-miR-214	3.27	1q24.3
hsa-miR-23b	2.75	9q22.32
hsa-miR-92	2.55	13q31.3
hsa-miR-25	2.40	7q22.1
hsa-miR-210	2.21	11p15.5
hsa-miR-212	2.17	17p13.3
hsa-miR-515-3	2.03	19q13.42
hsa-miR-146b	2.02	10q24.32
hsa-miR-21	1.86	17q23.1
hsa-miR-338	1.83	17q25.3
DOWN REGULATED miRNA		
hsa-miR-520h	-3.67	19q13.42
hsa-miR-197	-3.04	1p13.3
hsa-miR-378	-2.55	5q32
hsa-miR-135b	-2.36	1q32.1
hsa-miR-224	-2.32	Xq28
hsa-miR-34a	-2.23	1p36.22

Tabella XII. Elenco dei miRNA differenzialmente espressi tra campioni tumorali e controlli sani

DOWN REGULATED miRNA		
miRNA	SAM Score (d)	Chr. Band.
hsa-miR-155	-2.05	21q21.3
hsa-let-7i	-2.04	12q14.1
hsa-miR-146a	-1.90	5q34

Tabella XIII. Elenco dei miRNA differenzialmente espressi tra campioni tumorali con e senza metastasi.

5.2.3. DISCUSSIONE

Alcuni tra i miRNA risultati deregolati nei campioni affetti da tumore del cavo orale a cellule squamose, sono noti regolatori del processo oncogenico. Tra i vari miRNA sovraespressi, è significativa la presenza dell'oncomir21, noto per essere sovraespresso in diversi tipi di tumore tra cui quello al colon, al polmone, al fegato, allo stomaco, alla milza, al pancreas e nel glioblastoma. E' stato dimostrato che il silenziamento del mir21, in linee cellulari di glioblastoma, porta all'attivazione dell'apoptosi caspasi-mediata, suggerendo che questo miRNA possa avere un'attività antiapoptotica [103]. L'importanza del mir21, nel processo neoplastico, si deve al suo duplice effetto biologico che prevede il controllo non solo della crescita del tumore ma anche della sua capacità invasiva e metastatizzante; controllo reso possibile dalla repressione simultanea di diversi oncosoppressori quali TPM1, PDCD4 e PTEN, tutti coinvolti nella comparsa e/o nella progressione tumorale. L'inibizione di PTEN, ad esempio, porta all'attivazione costitutiva di alcuni componenti del pathway PI3K tra cui Akt ed ha come conseguenza la progressione tumorale anche in senso metastatico [104]. Ancora, la tropomiosina 1 (TPM1), è una proteina in grado di legare i filamenti di actina e di stabilizzarli, controllando le riorganizzazioni citoscheletriche che si verificano in una cellula tumorale. La sua espressione, necessaria a contenere la trasformazione maligna, è risultata alterata in diversi tipi di cancro [105]. La proteina PDCD4, infine, regola la trascrizione e traduzione di diverse proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare, del differenziamento e dello sviluppo tumorale. Diminuzioni o perdite della sua espressione sono ritenute responsabili di un aumento di invasività in diversi tumori solidi [106]. E' interessante notare che una riduzione dell'espressione di PDCD4, si è osservata anche nel cancro orale a cellule squamose e che, la perdita di eterozigotità al locus che la codifica, è stata associata alla progressione del tumore (vedi paragrafo 5.4.1) [107].

Anche il mir214, risultato sovra-espresso nei campioni tumorali, regola la proliferazione cellulare attraverso il pathway mediato da PTEN. In particolare, è stato dimostrato che questo miRNA è in grado di conferire resistenza ad agenti chemioterapici quali il cisplatino, sia nel cancro ovarico [108] che nel cancro a cellule squamose della lingua [109]. I dati in letteratura sono discordanti mostrando una sovraespressione del mir-214 nel cancro polmonare, pancreatico e gastrico ed una riduzione della sua espressione nell'epatocarcinoma, suggerendo che il mir-214 sia in grado di esplicare una molteplicità di funzioni, attraverso pathways specifici per le diverse forme tumorali.

Il mir-129-1, che sembra svolgere un'importante attività di soppressione tumorale, è risultato deregolato in diverse neoplasie. In particolare, la sua espressione è risultata significativamente ridotta nel tumore gastrico, colon-rettale e nell'adenocarcinoma [110]; mentre la sua sovraespressione, nel tumore esofageo, è considerata un fattore predittivo di comparsa della patologia e correla con una scarsa percentuale di sopravvivenza [111]. La sovraespressione di questo miRNA si traduce nella soppressione di alcuni pathways di trasduzione del segnale, come quello mediato dalla proteina APC, coinvolta nella migrazione ed adesione cellulare, nella segregazione cromosomica, nell'apoptosi e nel differenziamento neuronale [112]. Il gene che lo codifica, inoltre, mappa in 7q32, una regione cromosoma che ospita il sito fragile FRA7H, frequentemente deleta in diversi tipi di tumori solidi [113].

Pochi invece i dati a disposizione in letteratura circa il ruolo di mir-338 nel cancro, tuttavia è risultato sovraespresso in uno studio condotto sul carcinoma della lingua [114] e in un modello murino di cancro orale indotto chimicamente [115]. Questi dati supportano così i nostri risultati e l'ipotesi che mir-338 sia specificamente coinvolto nei tumori orali.

Tra i 6 miRNA la cui espressione nei tessuti tumorali è risultata inferiore a quella dei controlli, mir-34 risulta particolarmente interessante.

Il mir-34 è stato descritto per la prima volta come un potente oncosoppressore nel neuroblastoma [116] e successivamente gli è stato riconosciuto un coinvolgimento anche nella regolazione del ciclo cellulare e dell'apoptosi [117,118].

Diminuzioni della sua espressione sono state associate a melanoma, a cancro del colon, del pancreas, del polmone e della prostata; nessun dato pubblicato, invece sembra metterlo in relazione al cancro orale. Recentemente, è stato dimostrato che il mir34 è un target trascrizionale della proteina p53 [119]. Per questo motivo si ritiene che riduzioni nell'espressione del mir34 siano dovute a mutazioni inattivanti a carico di p53 [120]. Tra i principali bersagli del mir-34 troviamo alcuni geni implicati nel controllo del ciclo cellulare e della senescenza (CycE2, CDK4, CDK6), dell'apoptosi (Bcl2), e della metastatizzazione ed invasione a lunga distanza (c-MET) [121,122].

Solo tre miRNA (mir-155, let-7i ed il mir-146a) invece, sono risultati differenzialmente espressi nei tumori con metastasi, rispetto ai tumori non metastatici.

Nell'uomo, let-7i appartiene alla famiglia di miRNA let 7 composta da 12 membri (let-7-a1, a2, a3, b, c, d, e, f1, f2, g, i e mir-98) i cui geni sono localizzati su 8 cromosomi differenti. I bersagli di questi 12 miRNA sono spesso sovrapponibili, e lo sono anche le funzioni che svolgono all'interno della cellula. Un sempre maggior numero di evidenze

correlano la famiglia let-7 alla comparsa e progressione tumorale. Secondo alcuni ricercatori, infatti, let-7 agirebbe da oncosoppressore andando ad inibire l'espressione di oncogeni quali RAS e c-Myc e di geni chiave nel ciclo e nella divisione cellulare [123]. Sebbene i componenti della famiglia let-7 siano stati tra i primi miRNA ad essere identificati nell'uomo, e i primi ad essere classificati come oncomir, solo recentemente si sono avute indicazioni sul loro coinvolgimento anche nel tumore di testa e collo. Kakamiw e colleghi hanno infatti dimostrato che diminuzioni nei livelli di espressione di let-7b, mediate da un up regolazione del target Diecer, contribuiscono ad incrementare la capacità proliferativa delle cellule [124]. Il silenziamento di let-7d, in OSCC, sembra promuovere sia la Transizione Epitelio-Mesenchimale (EMT) e di conseguenza le capacità migratorie ed invasive delle cellule, sia la resistenza agli agenti chemioterapici [125].

I mir-146a e 146b sono codificati da due geni distinti, ma che differiscono tra loro per soli due nucleotidi in prossimità dell'estremità 3'. Inoltre, i loro prodotti maturi hanno funzioni e bersagli molecolari simili. I nostri risultati mostrano che, mentre l'espressione del mir-146b è significativamente incrementata in tutti gli stadi tumorali, quella del mir-146a è specifica per gli stadi più aggressivi, permettendo così di discriminare i tumori metastatici dai non metastatici.

In diversi studi si è cercata una correlazione tra la deregolazione di mir-155 e mir-146a/b e la genesi differenziazione neoplastica, ma restano ancora molte cose da capire sulla funzione biologica di questi due miRNA. Nel tumore orale a cellule squamose e nel cancro cervicale, entrambi i miRNA sono risultati sovra espressi [126,127], mentre in uno studio sul cancro a cellule squamose del polmone, questa sovraespressione è stata considerata predittiva di una prognosi infausta [128]. Il mir-155 è risultato espresso nel pancreas di individui sani ma assente in tumori del pancreas endocrino [129], inoltre è apparso sovraespresso in alcuni tipi di tumore [130] e sottoregolato in altri [131], suggerendo che questo miRNA possa agire sia come oncosoppressore od oncogene a seconda del target molecolare e del tessuto in cui viene espresso.

La sovra espressione ectopica del miR-146a e/o del miR-146b in una linea cellulare di cancro polmonare con elevato potenziale metastatico, ha portato all'inibizione di entrambe le attività migratoria ed invasiva, necessarie per la formazione di metastasi, mettendo in evidenza l'influenza che queste molecole possono avere, non solo nella comparsa, ma anche nella progressione tumorale [132].

Riassumendo, in questo studio siamo riusciti a mettere in evidenza alcuni miRNA differenzialmente espressi nei campioni tumorali rispetto ai controlli e nei metastatici

rispetto ai non metastatici. Tra questi miRNA, alcuni sono stati caratterizzati come oncogeni altri come oncosoppressori, in diverse forme tumorali. Riuscire a migliorare la comprensione delle basi genetiche di questa patologia complessa ed eterogenea potrebbe promuovere l'utilizzo di alcuni miRNA come marcatori diagnostici e prognostici del cancro orale a cellule squamose, ed essere così di ausilio per offrire ad ogni paziente un una diagnosi molecolare personalizzata che favorisca la scelta della miglior cura, avente il miglior rapporto invasività/efficacia.

5.3. ANALISI DEL POLIMORFISMO rs2910164 in hsa-mir-146a

5.3.1. BACKGROUND SCIENTIFICO

Tra i miRNA significativamente sottoespressi nei campioni con metastasi linfonodali rispetto ai non metastatici, uno in particolare, il mir-146a, è sembrato interessante per la presenza al suo interno di un polimorfismo funzionale, indicato come rs2910164. E' stato proposto che la sostituzione nucleotidica che caratterizza questo SNP (G>C) ostacoli la formazione della struttura a forcina del pre-mir necessaria per la corretta maturazione del miR-146a [133]. E' stata inoltre evidenziata una correlazione tra questo SNP e la suscettibilità ad alcune forme tumorali tra cui il cancro alla prostata, al polmone ed il carcinoma a cellule squamose di testa e collo, ed esofago [134-136].

Per questi motivi abbiamo deciso di verificare se gli individui portatori della variante allelica nel gene hsa-mir-146a possano avere una congenita predisposizione a sviluppare tumori orali o ad avere tumori orali piu' aggressivi.

5.3.2. RISULTATI

Un campione costituito da 360 pazienti affetti OSCC è stato sottoposto al test per la caratterizzazione del genotipo al locus rs2910164. La distribuzione dei genotipi ottenuti mediante analisi in Real-Time PCR, è risultata in equilibrio di Hardy-Weinberg. Il test di associazione allelica, mediante il confronto con i genotipi di popolazioni di controllo, ha evidenziato che le frequenze alleliche dei pazienti non si discostano in maniera significativa da quelle di entrambi i controlli, escludendo l'esistenza di una possibile associazione tra lo SNP del mir-146a e la comparsa di OSCC.

Per valutare l'esistenza di associazione tra lo SNP e la progressione del tumore, i genotipi sono stati stratificati in base alla presenza di metastasi o in base allo stadio UICC. Il test di associazione ha comparato dapprima i tumori metastatici ai non metastatici, e successivamente ha confrontato ogni stadio di gravità con quello successivo, più aggressivo. Più precisamente, i controlli sono stati confrontati con i genotipi dello stadio I, quelli dello stadio I con i genotipi ottenuti per lo stadio III e così via.

Le analisi hanno evidenziato un'unica associazione significativa ($P=0.02$), tra il polimorfismo indagato e l'aggravarsi della patologia da stadio I a II; l'allele mutato C è risultato infatti molto più rappresentato nei pazienti con OSCC più aggressivo. Gli individui portatori della variante allelica rara, mostrano una maggior probabilità di progredire allo stadio II rispetto agli stessi dello stadio I. Più precisamente, l'odds ratio per i soggetti

eterozigoti è risultato pari ad 1.75 (con un intervallo di confidenza al 95% compreso tra 0.99 e 3.10), mentre quello per gli omozigoti è pari a 3.25 (intervallo di confidenza al 95% compreso tra 1.05 e 10.02)(Tabella XIV).

	n	GG	GC	CC	MAF ^a	P value
OSCC						
OSCC	347	200	126	21	0.24	ref
CONTROLS						
Germany	904	536	318	50	0.23	0.57
Tuscany	88	50	31	7	0.26	0.71
LYMPH NODE METASTASIS						
N0	252	146	91	15	0.24	ref
N1	87	51	32	4	0.23	0.79
TUMOR GRADE						
I	139	85	48	6	0.22	0.57 ^b
II	74	35	31	8	0.32	0.02 ^c
III	46	26	17	3	0.25	0.56 ^c
IV	79	51	26	2	0.19	0.26 ^c

Tabella XIV. Distribuzione dei genotipi per il polimorfismo rs2910164, e risultati dell'analisi di differenza delle frequenze alleliche.

^a Minor Allele Frequency; ^b rispetto alla popolazione controllo TSI; ^c rispetto allo stadio tumorale precedente.

5.3.3. DISCUSSIONE

In base ai risultati ottenuti dagli esperimenti con i microarray ed ai della letteratura emerge concretamente la possibilità che mir-146a possa giocare un ruolo nella genesi e nella progressione dell'OSCC, anche se con modalità ancora da chiarire.

Il polimorfismo rs2910164, sembra in grado di influenzare i livelli di espressione della forma matura di mir-146a, ma i dati riguardanti l'associazione con tipi differenti di tumori ha dato risultati eterogenei. Shi e colleghi, ad esempio, hanno dimostrato che la variante C porta ad un accumulo del miRNA maturo e predispone alla comparsa di cancro ovarico ed al seno [137]. In uno studio condotto da Yue, l'allele G sembra causare una minor produzione di miRNA maturo, ma un maggior rischio di cancro cervicale [138], mentre per Xi e collaboratori, questa variante allelica è associata a tumore del fegato e ad un accumulo di mir-146a maturo. Una tale eterogeneità nei risultati, sembra essere non solo tumore specifica ma anche etnia specifica. Nella popolazione Caucasica, ad esempio, la variante C è stata correlata alla comparsa di metastasi linfonodali e ad un incremento di espressione di mir-146 nei pazienti affetti da OSCC [139].

I risultati ottenuti nella ricerca che ho condotto con 347 pazienti affetti da OSCC , escludono l'associazione tra le varianti alleliche di rs2910164 e la comparsa del tumore orale. Le frequenze alleliche e genotipiche ottenute nei casi sono infatti paragonabili a quelle ottenute nei controlli. Una lieve differenza è stata riscontrata tra i soggetti affetti di grado II, rispetto ai soggetti allo stadio I (secondo la classificazione IUCC). Ciò significherebbe che la riduzione di espressività di mir-146a, dovuta all'allele raro, possa favorire il passaggio tra stadio I e stadio II. Questa piccola spinta sarebbe tuttavia insufficiente a favorire la progressione verso gli stadi III e IV. Tuttavia questi dati richiedono una verifica in quanto non sono supportati da un'elevata significatività statistica.

Secondo quanto pubblicato in una recente meta-analisi, in cui si sono analizzati i dati di 19 studi caso controllo condotti sulle popolazioni Caucasica ed Asiatica [140], esisterebbe un'associazione significativa tra lo SNP rs2910164 e la comparsa di cancro, solo nella popolazione Asiatica ma non nella popolazione Caucasica, confermando così in parte i nostri risultati. Ad oggi, tuttavia, i risultati in letteratura restano inconclusivi, e si rendono necessarie ulteriori indagini per chiarire il ruolo di questo miRNA nella cancerogenesi.

6. CONCLUSIONI

CONCLUSIONI

Uno dei principali obiettivi nella diagnosi del cancro orale a cellule squamose è l'identificazione di caratteristiche molecolari che possano essere utilizzate come marcatori per neoplastici, una migliore caratterizzazione del tumore in fase diagnostica. Infatti le sole caratteristiche utilizzate per la stadiazione classica non sono di grande aiuto per la pianificazione del trattamento e per determinare una prognosi accurata. Inoltre l'individuazione di profili genetici di rischio individuale, permetterebbe e potrebbe favorire non solo una maggior comprensione della patologia ma anche la prevenzione e la diagnosi precoce della malattia.

Nella prima parte del mio progetto di Dottorato ho valutato la perdita di eterozigotità come possibile causa della deregolazione di alcuni noti oncosoppressori. I dati ottenuti hanno evidenziato l'importanza di tale riarrangiamento e dei geni PDCD4, CTNB1, CASP4 ed HSP23, nella comparsa e progressione del carcinoma orale.

Successivamente, l'analisi del profilo di espressione dei miRNA, ha portato all'identificazione di alcuni miRNA che sembrano coinvolti non solo nella comparsa ma anche nella metastatizzazione del tumore.

In entrambi i casi, sono necessarie indagini più approfondite per capire se queste molecole possano realmente trovare impiego come marcatori diagnostici e prognostici di OSCC e come target nella terapia genica.

7. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- [1] M. Pentenero, M. Carrozzo, M. Pagano, D. Galliano, R. Broccoletti, C. Scully and S. Gandolfo, Oral mucosal dysplastic lesions and early squamous cell carcinomas: underdiagnosis from incisional biopsy, *Oral Dis* **9** (2003), 68-72.
- [2] T.W. Remmerbach, H. Weidenbach, A. Hemprich and A. Bocking, Earliest detection of oral cancer using non-invasive brush biopsy including DNA-image-cytometry: report on four cases, *Anal Cell Pathol* **25** (2003), 159-166.
- [3] A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward and D. Forman, Global Cancer Statistic, *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **61** (2011), 69-90.
- [4] J. Ferlay, D.M. Parkin and E. Steliarova-Foucher, Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008, *Eur J Cancer* **46**, 765-781.
- [5] C. La Vecchia, F. Lucchini, E. Negri and F. Levi, Trends in oral cancer mortality in Europe, *Oral Oncol* **40** (2004), 433-439.
- [6] W. Garavello, P. Bertuccio, F. Levi, F. Lucchini, C. Bosetti, M. Malvezzi, E. Negri and C. La Vecchia, The oral cancer epidemic in central and eastern Europe, *Int J Cancer* **127**, 160-171.
- [7] S.K. Mithani, W.K. Mydlarz, F.L. Grumbine, I.M. Smith and J.A. Califano, Molecular genetics of premalignant oral lesions, *Oral Dis* **13** (2007), 126-133.
- [8] S. Warnakulasuriya, G. Sutherland and C. Scully, Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence, *Oral Oncol* **41** (2005), 244-260.
- [9] P. Lazarus and J.Y. Park, Metabolizing enzyme genotype and risk for upper aerodigestive tract cancer, *Oral Oncol* **36** (2000), 421-431.
- [10] S.N. Drummond, R.S. Gomez, J.C. Motta Noronha, I.A. Pordeus, A.A. Barbosa and L. De Marco, Association between GSTT-1 gene deletion and the susceptibility to oral squamous cell carcinoma in cigarette-smoking subjects, *Oral Oncology* **41** (2005), 515-519.
- [11] M. Singh, P.P. Shah, A.P. Singh, M. Ruwali, N. Mathur, M.C. Pant and D. Parmar, Association of genetic polymorphisms in glutathione S-transferases and susceptibility to head and neck cancer, *Mutat Res* **638** (2008), 184-194.
- [12] B. Secretan, K. Straif, R. Baan, Y. Grosse, F. El Ghissassi, V. Bouvard, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, C. Freeman, L. Galichet and V. Coglianò, A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish, *Lancet Oncol* **10** (2009), 1033-1034.

- [13] G.R. Ogden and A.J. Wight, Aetiology of oral cancer: alcohol, *Br J Oral Maxillofac Surg* **36** (1998), 247-251.
- [14] N.M. Howie, T.K. Trigkas, A.T. Cruchley, P.W. Wertz, C.A. Squier and D.M. Williams, Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa, *Oral Dis* **7** (2001), 349-354.
- [15] N. Homann, H. Jousimies-Somer, K. Jokelainen, R. Heine and M. Salaspuro, High acetaldehyde levels in saliva after ethanol consumption: methodological aspects and pathogenetic implications, *Carcinogenesis* **18** (1997), 1739-1743.
- [16] H.K. Seitz, S. Matsuzaki, A. Yokoyama, N. Homann, S. Vakevainen and X.D. Wang, Alcohol and cancer, *Alcohol Clin Exp Res* **25** (2001), 1375-1435.
- [17] W. Garavello, E. Lucenteforte, C. Bosetti and C. La Vecchia, The role of foods and nutrients on oral and pharyngeal cancer risk, *Minerva Stomatol* **58** (2009), 25-34.
- [18] E. Lucenteforte, W. Garavello, C. Bosetti and C. La Vecchia, Dietary factors and oral and pharyngeal cancer risk, *Oral Oncol* **45** (2009), 461-467.
- [19] R.B. Zain, Cultural and dietary risk factors of oral cancer and precancer--a brief overview, *Oral Oncol* **37** (2001), 205-210.
- [20] P. Holmstrup, P. Vedtofte, J. Reibel and K. Stoltze, Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions, *Oral Oncol* **42** (2006), 461-474.
- [21] A.J. Lax and W. Thomas, How bacteria could cause cancer: one step at a time, *Trends Microbiol* **10** (2002), 293-299.
- [22] J.H. Meurman and I. Stamatova, Probiotics: contributions to oral health, *Oral Dis* **13** (2007), 443-451.
- [23] J.H. Meurman and J. Uttamo, Oral micro-organisms in the etiology of cancer, *Acta Odontol Scand* **66** (2008), 321-326.
- [24] N. Homann, J. Tillonen, J.H. Meurman, H. Rintamaki, C. Lindqvist, M. Rautio, H. Jousimies-Somer and M. Salaspuro, Increased salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers and smokers: a microbiological approach to oral cavity cancer, *Carcinogenesis* **21** (2000), 663-668.
- [25] C. Ostwald, P. Muller, M. Barten, K. Rutsatz, M. Sonnenburg, K. Milde-Langosch and T. Loning, Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal mucosa, *J Oral Pathol Med* **23** (1994), 220-225.
- [26] C.S. Miller and B.M. Johnstone, Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **91** (2001), 622-635.

- [27] I.O. Thompson, C.W. van Wyk and M.R. Darling, Human vaginal epithelium and the epithelial lining of a cyst model constructed from it: a comparative light microscopic and electron microscopic study, *Sadj* **56** (2001), 517-520.
- [28] D.M. Shin, J.Y. Ro, W.K. Hong and W.N. Hittelman, Dysregulation of epidermal growth factor receptor expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis, *Cancer Res* **54** (1994), 3153-3159.
- [29] F. Dayyani, C.J. Etzel, M. Liu, C.H. Ho, S.M. Lippman and A.S. Tsao, Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC), *Head Neck Oncol* **2**, 15.
- [30] A.M. Goldstein, W.J. Blot, R.S. Greenberg, J.B. Schoenberg, D.F. Austin, S. Preston-Martin, D.M. Winn, L. Bernstein, J.K. McLaughlin and J.F. Fraumeni, Jr., Familial risk in oral and pharyngeal cancer, *Eur J Cancer B Oral Oncol* **30B** (1994), 319-322.
- [31] W.D. Foulkes, J.S. Brunet, W. Sieh, M.J. Black, G. Shenouda and S.A. Narod, Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study, *Bmj* **313** (1996), 716-721.
- [32] J.D. McKay, T. Truong, V. Gaborieau, A. Chabrier, S.C. Chuang, G. Byrnes, D. Zaridze, O. Shangina, N. Szeszenia-Dabrowska, J. Lissowska, P. Rudnai, E. Fabianova, A. Bucur, V. Bencko, I. Holcatova, V. Janout, L. Foretova, P. Lagiou, D. Trichopoulos, S. Benhamou, C. Bouchardy, W. Ahrens, F. Merletti, L. Richiardi, R. Talamini, L. Barzan, K. Kjaerheim, G.J. Macfarlane, T.V. Macfarlane, L. Simonato, C. Canova, A. Agudo, X. Castellsague, R. Lowry, D.I. Conway, P.A. McKinney, C.M. Healy, M.E. Toner, A. Znaor, M.P. Curado, S. Koifman, A. Menezes, V. Wunsch-Filho, J.E. Neto, L.F. Garrote, S. Boccia, G. Cadoni, D. Arzani, A.F. Olshan, M.C. Weissler, W.K. Funkhouser, J. Luo, J. Lubinski, J. Trubicka, M. Lener, D. Oszutowska, S.M. Schwartz, C. Chen, S. Fish, D.R. Doody, J.E. Muscat, P. Lazarus, C.J. Gallagher, S.C. Chang, Z.F. Zhang, Q. Wei, E.M. Sturgis, L.E. Wang, S. Franceschi, R. Herrero, K.T. Kelsey, M.D. McClean, C.J. Marsit, H.H. Nelson, M. Romkes, S. Buch, T. Nukui, S. Zhong, M. Lacko, J.J. Manni, W.H. Peters, R.J. Hung, J. McLaughlin, L. Vatten, I. Njolstad, G.E. Goodman, J.K. Field, T. Liloglou, P. Vineis, F. Clavel-Chapelon, D. Palli, R. Tumino, V. Krogh, S. Panico, C.A. Gonzalez, J.R. Quiros, C. Martinez, C. Navarro, E. Ardanaz, N. Larranaga, K.T. Khaw, T. Key, H.B. Bueno-de-Mesquita, P.H. Peeters, A. Trichopoulou, J. Linseisen, H. Boeing, G. Hallmans, K. Overvad, A. Tjonneland, M. Kumle, E. Riboli, K. Valk, T. Vooder, A. Metspalu, D. Zelenika, A. Boland, M. Delepine, M. Foglio, D. Lechner, H. Blanche, I.G. Gut, P. Galan, S. Heath, M.

- Hashibe, R.B. Hayes, P. Boffetta, M. Lathrop and P. Brennan, A genome-wide association study of upper aerodigestive tract cancers conducted within the INHANCE consortium, *PLoS Genet* **7**, e1001333.
- [33] C. Canova, L. Richiardi, F. Merletti, M. Pentenero, C. Gervasio, G. Tanturri, P. Garzino-Demo, G. Pecorari, R. Talamini, L. Barzan, S. Sulfaro, G. Franchini, C. Muzzolini, S. Bordin, G.N. Pugliese, E. Macri and L. Simonato, Alcohol, tobacco and genetic susceptibility in relation to cancers of the upper aerodigestive tract in northern Italy, *Tumori* **96**, 1-10.
- [34] N. Masood, M.A. Kayani, F.A. Malik, I. Mahjabeen, R.M. Baig and R. Faryal, Genetic variation in carcinogen metabolizing genes associated with oral cancer in pakistani population, *Asian Pac J Cancer Prev* **12**, 491-495.
- [35] H.J. van Zeeburg, P.J. Snijders, T. Wu, E. Gluckman, J. Soulier, J. Surralles, M. Castella, J.E. van der Wal, J. Wennerberg, J. Califano, E. Velleuer, R. Dietrich, W. Ebell, E. Bloemena, H. Joenje, C.R. Leemans and R.H. Brakenhoff, Clinical and molecular characteristics of squamous cell carcinomas from Fanconi anemia patients, *J Natl Cancer Inst* **100** (2008), 1649-1653.
- [36] L.A. Liotta, Tumor invasion and metastases--role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture, *Cancer Res* **46** (1986), 1-7.
- [37] A.S. Berkower and H.F. Biller, Head and neck cancer associated with Bloom's syndrome, *Laryngoscope* **98** (1988), 746-748.
- [38] C. Scully, J.K. Field and H. Tanzawa, Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control, *Oral Oncol* **36** (2000), 256-263.
- [39] D. Hanahan and R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer, *Cell* **100** (2000), 57-70.
- [40] D. Sidransky, Molecular markers in cancer diagnosis, *J Natl Cancer Inst Monogr* (1995), 27-29.
- [41] J. Califano, P. van der Riet, W. Westra, H. Nawroz, G. Clayman, S. Piantadosi, R. Corio, D. Lee, B. Greenberg, W. Koch and D. Sidransky, Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization, *Cancer Res* **56** (1996), 2488-2492.
- [42] R. Todd, M.Y. Chou, K. Matossian, G.T. Gallagher, R.B. Donoff and D.T. Wong, Cellular sources of transforming growth factor-alpha in human oral cancer, *J Dent Res* **70** (1991), 917-923.

- [43] J.R. Grandis and D.J. Tweardy, Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer, *Cancer Res* **53** (1993), 3579-3584.
- [44] R. Bei, A. Budillon, L. Masuelli, V. Cereda, D. Vitolo, E. Di Gennaro, V. Ripavecchia, C. Palumbo, F. Ionna, S. Losito, A. Modesti, M.H. Kraus and R. Muraro, Frequent overexpression of multiple ErbB receptors by head and neck squamous cell carcinoma contrasts with rare antibody immunity in patients, *J Pathol* **204** (2004), 317-325.
- [45] R.J. Leeman, V.W. Lui and J.R. Grandis, STAT3 as a therapeutic target in head and neck cancer, *Expert Opin Biol Ther* **6** (2006), 231-241.
- [46] R. Miyamoto, N. Uzawa, S. Nagaoka, Y. Hirata and T. Amagasa, Prognostic significance of cyclin D1 amplification and overexpression in oral squamous cell carcinomas, *Oral Oncol* **39** (2003), 610-618.
- [47] A. Rousseau, M.S. Lim, Z. Lin and R.C. Jordan, Frequent cyclin D1 gene amplification and protein overexpression in oral epithelial dysplasias, *Oral Oncol* **37** (2001), 268-275.
- [48] B. Popovic, B. Jekic, I. Novakovic, L.J. Lukovic, Z. Tepavcevic, V. Jurisic, M. Vukadinovic and J. Milasin, Bcl-2 expression in oral squamous cell carcinoma, *Ann N Y Acad Sci* **1095** (2007), 19-25.
- [49] J.O. Boyle, J. Hakim, W. Koch, P. van der Riet, R.H. Hruban, R.A. Roa, R. Correo, Y.J. Eby, J.M. Ruppert and D. Sidransky, The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer, *Cancer Res* **53** (1993), 4477-4480.
- [50] T. Tsuji, Y. Mimura, S. Wen, X. Li, A. Kanekawa, K. Sasaki and F. Shinozaki, The significance of PCNA and p53 protein in some oral tumors, *Int J Oral Maxillofac Surg* **24** (1995), 221-225.
- [51] M.J. Caminero, F. Nunez, C. Suarez, P. Ablanado, J.R. Riera and F. Dominguez, Detection of p53 protein in oropharyngeal carcinoma. Prognostic implications, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **122** (1996), 769-772.
- [52] S.C. Girod, P. Pfeiffer, J. Ries and H.D. Pape, Proliferative activity and loss of function of tumour suppressor genes as 'biomarkers' in diagnosis and prognosis of benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma, *Risultati di ricerca British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **36** (1998), 252-260.
- [53] P. Pande, M. Mathur, N.K. Shukla and R. Ralhan, pRb and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis, *Oral Oncol* **34** (1998), 396-403.

- [54] J.W. Shay and W.E. Wright, Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions, *Nat Rev Drug Discov* **5** (2006), 577-584.
- [55] J. Palani, V. Lakshminarayanan and R. Kannan, Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in oral cancer and pre-cancer, *Indian J Dent Res* **22**, 362.
- [56] H.H. Chen, C.H. Yu, J.T. Wang, B.Y. Liu, Y.P. Wang, A. Sun, T.C. Tsai and C.P. Chiang, Expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein is significantly associated with the progression, recurrence and prognosis of oral squamous cell carcinoma in Taiwan, *Oral Oncology* **43** (2007), 122-129.
- [57] J. Folkman, What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?, *J Natl Cancer Inst* **82** (1990), 4-6.
- [58] B.C. Denhart, A.J. Guidi, K. Tognazzi, H.F. Dvorak and L.F. Brown, Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in oral and laryngeal squamous cell carcinoma and dysplasia, *Lab Invest* **77** (1997), 659-664.
- [59] J. Carlile, K. Harada, R. Baillie, M. Macluskey, D.M. Chisholm, G.R. Ogden, S.L. Schor and A.M. Schor, Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissues: possible relevance to angiogenesis, tumour progression and field cancerisation, *J Oral Pathol Med* **30** (2001), 449-457.
- [60] P.A. Kyzas, I.W. Cunha and J.P. Ioannidis, Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis, *Clin Cancer Res* **11** (2005), 1434-1440.
- [61] A.F. Chambers, A.C. Groom and I.C. MacDonald, Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites, *Nat Rev Cancer* **2** (2002), 563-572.
- [62] J.P. Thiery, Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression, *Nat Rev Cancer* **2** (2002), 442-454.
- [63] G.F. Huber, L. Zullig, A. Soltermann, M. Roessle, N. Graf, S.K. Haerle, G. Studer, W. Jochum, H. Moch and S.J. Stoeckli, Down regulation of E-Cadherin (ECAD) - a predictor for occult metastatic disease in sentinel node biopsy of early squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx, *BMC Cancer* **11**, 217:211-218.
- [64] G.J. Thomas and P.M. Speight, Cell adhesion molecules and oral cancer, *Crit Rev Oral Biol Med* **12** (2001), 479-498.
- [65] G. Cortesina, M. Sacchi, M. Bussi, B. Panizzut, S. Ferro, M.T. Carlevato and P.C. Marchisio, Integrin expression in head and neck cancers, *Acta Otolaryngol* **115** (1995), 328-330.

- [66] G.J. Thomas, M.L. Nystrom and J.F. Marshall, Alphavbeta6 integrin in wound healing and cancer of the oral cavity, *J Oral Pathol Med* **35** (2006), 1-10.
- [67] H. Kawamata, D. Uchida, H. Hamano, T. Kimura-Yanagawa, K.I. Nakashiro, S. Hino, F. Omotehara, H. Yoshida and M. Sato, Active-MMP2 in cancer cell nests of oral cancer patients: correlation with lymph node metastasis, *Int J Oncol* **13** (1998), 699-704.
- [68] S. Kurahara, M. Shinohara, T. Ikebe, S. Nakamura, M. Beppu, A. Hiraki, H. Takeuchi and K. Shirasuna, Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis, *Head Neck* **21** (1999), 627-638.
- [69] L.K. Makinen, V. Hayry, T. Atula, C. Haglund, H. Keski-Santti, I. Leivo, A. Makitie, F. Passador-Santos, C. Bockelman, T. Salo, T. Sorsa and J. Hagstrom, Prognostic significance of matrix metalloproteinase-2, -8, -9, and -13 in oral tongue cancer, *J Oral Pathol Med*.
- [70] A.G. Knudson, Antioncogenes and human cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (1993), 10914-10921.
- [71] A.J. Bishop and R.H. Schiestl, Homologous recombination as a mechanism for genome rearrangements: environmental and genetic effects, *Hum Mol Genet* **9** (2000), 2427-2334.
- [72] S.W. Wijnhoven, H.J. Kool, C.M. van Teijlingen, A.A. van Zeeland and H. Vrieling, Loss of heterozygosity in somatic cells of the mouse. An important step in cancer initiation?, *Mutat Res* **473** (2001), 23-36.
- [73] D. Lasko, W. Cavenee and M. Nordenskjold, Loss of constitutional heterozygosity in human cancer, *Annu Rev Genet* **25** (1991), 281-314.
- [74] H. Tachida and M. Iizuka, Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage, *Genetics* **131** (1992), 471-478.
- [75] P.K. Ha, S.S. Chang, C.A. Glazer, J.A. Califano and D. Sidransky, Molecular techniques and genetic alterations in head and neck cancer, *Oral Oncol* **45** (2009), 335-339.
- [76] Y. Lee, M. Kim, J. Han, K.H. Yeom, S. Lee, S.H. Baek and V.N. Kim, MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II, *Embo J* **23** (2004), 4051-4060.
- [77] E. Lund, S. Guttinger, A. Calado, J.E. Dahlberg and U. Kutay, Nuclear export of microRNA precursors, *Science* **303** (2004), 95-98.

- [78] G. Hutvagner, J. McLachlan, A.E. Pasquinelli, E. Balint, T. Tuschl and P.D. Zamore, A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA, *Science* **293** (2001), 834-838.
- [79] L. He and G.J. Hannon, MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation, *Nat Rev Genet* **5** (2004), 522-531.
- [80] G.A. Calin and C.M. Croce, MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale, *Cancer Res* **66** (2006), 7390-7394.
- [81] J. Takamizawa, H. Konishi, K. Yanagisawa, S. Tomida, H. Osada, H. Endoh, T. Harano, Y. Yatabe, M. Nagino, Y. Nimura, T. Mitsudomi and T. Takahashi, Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival, *Cancer Res* **64** (2004), 3753-3756.
- [82] G.A. Calin, C.D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich and C.M. Croce, Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia, *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (2002), 15524-15529.
- [83] L. Scapoli, A. Palmieri, C. Rubini, M. Martinelli, G. Spinelli, F. Ionna and F. Carinci, Low prevalence of human papillomavirus in squamous-cell carcinoma limited to oral cavity proper, *Mod Pathol* **22** (2009), 366-372.
- [84] I. Catucci, R. Yang, P. Verderio, S. Pizzamiglio, L. Heesen, K. Hemminki, C. Sutter, B. Wappenschmidt, M. Dick, N. Arnold, P. Bugert, D. Niederacher, A. Meindl, R.K. Schmutzler, C.C. Bartram, F. Ficarazzi, L. Tizzoni, D. Zaffaroni, S. Manoukian, M. Barile, M.A. Pierotti, P. Radice, B. Burwinkel and P. Peterlongo, Evaluation of SNPs in miR-146a, miR196a2 and miR-499 as low-penetrance alleles in German and Italian familial breast cancer cases, *Hum Mutat* **31**, E1052-1057.
- [85] L. Cawkwell, F.A. Lewis and P. Quirke, Frequency of allele loss of DCC, p53, RBI, WT1, NF1, NM23 and APC/MCC in colorectal cancer assayed by fluorescent multiplex polymerase chain reaction, *Br J Cancer* **70** (1994), 813-818.
- [86] V.G. Tusher, R. Tibshirani and G. Chu, Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response, *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (2001), 5116-5121.
- [87] L. Lo Muzio, G. Campisi, A. Farina, C. Rubini, G. Pannone, R. Serpico, G. Laino, A. De Lillo and F. Carinci, P-cadherin expression and survival rate in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study, *BMC Cancer* **5** (2005), 63.

- [88] F. Carinci, L. Lo Muzio, A. Piattelli, C. Rubini, F. Chiesa, F. Ionna, A. Palmieri, E. Maiorano, A. Pastore, G. Laino, M. Dolci and F. Pezzetti, Potential markers of tongue tumor progression selected by cDNA microarray, *Int J Immunopathol Pharmacol* **18** (2005), 513-524.
- [89] H. Allgayer, Pcd4, a colon cancer prognostic that is regulated by a microRNA, *Crit Rev Oncol Hematol* **73**, 185-191.
- [90] B. Lankat-Buttgereit and R. Goke, The tumour suppressor Pcd4: recent advances in the elucidation of function and regulation, *Biol Cell* **101** (2009), 309-317.
- [91] H. Zhang, I. Ozaki, T. Mizuta, H. Hamajima, T. Yasutake, Y. Eguchi, H. Ideguchi, K. Yamamoto and S. Matsushashi, Involvement of programmed cell death 4 in transforming growth factor-beta1-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma, *Oncogene* **25** (2006), 6101-6112.
- [92] Y. Hiyoshi, H. Kamohara, R. Karashima, N. Sato, Y. Imamura, Y. Nagai, N. Yoshida, E. Toyama, N. Hayashi, M. Watanabe and H. Baba, MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma, *Clin Cancer Res* **15** (2009), 1915-1922.
- [93] Y. Chen, T. Knosel, G. Kristiansen, A. Pietas, M.E. Garber, S. Matsushashi, I. Ozaki and I. Petersen, Loss of PDCD4 expression in human lung cancer correlates with tumour progression and prognosis, *J Pathol* **200** (2003), 640-646.
- [94] N.A. Wei, S.S. Liu, T.H. Leung, K.F. Tam, X.Y. Liao, A.N. Cheung, K.K. Chan and H.Y. Ngan, Loss of Programmed cell death 4 (Pcd4) associates with the progression of ovarian cancer, *Mol Cancer* **8** (2009), 70.
- [95] J. Zhurinsky, M. Shtutman and A. Ben-Ze'ev, Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles, *J Cell Sci* **113 (Pt 18)** (2000), 3127-3139.
- [96] R. Nusse, Wnt signaling in disease and in development, *Cell Res* **15** (2005), 28-32.
- [97] A. Gasparoni, A. Chaves, L. Fonzi, G.K. Johnson, G.B. Schneider and C.A. Squier, Subcellular localization of beta-catenin in malignant cell lines and squamous cell carcinomas of the oral cavity, *J Oral Pathol Med* **31** (2002), 385-394.
- [98] D.W. Nicholson, Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death, *Cell Death Differ* **6** (1999), 1028-1042.
- [99] H.S. Kim, J.W. Lee, Y.H. Soung, W.S. Park, S.Y. Kim, J.H. Lee, J.Y. Park, Y.G. Cho, C.J. Kim, S.W. Jeong, S.W. Nam, S.H. Kim, J.Y. Lee, N.J. Yoo and S.H. Lee, Inactivating mutations of caspase-8 gene in colorectal carcinomas, *Gastroenterology* **125** (2003), 708-715.

- [100] Y.H. Soung, J.W. Lee, S.Y. Kim, W.S. Park, S.W. Nam, J.Y. Lee, N.J. Yoo and S.H. Lee, Somatic mutations of CASP3 gene in human cancers, *Hum Genet* **115** (2004), 112-115.
- [101] Y.H. Soung, E.G. Jeong, C.H. Ahn, S.S. Kim, S.Y. Song, N.J. Yoo and S.H. Lee, Mutational analysis of caspase 1, 4, and 5 genes in common human cancers, *Hum Pathol* **39** (2008), 895-900.
- [102] Y.R. Kim, K.M. Kim, N.J. Yoo and S.H. Lee, Mutational analysis of CASP1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, and 14 genes in gastrointestinal stromal tumors, *Hum Pathol* **40** (2009), 868-871.
- [103] J.A. Chan, A.M. Krichevsky and K.S. Kosik, MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells, *Cancer Res* **65** (2005), 6029-6033.
- [104] I. Sansal and W.R. Sellers, The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway, *J Clin Oncol* **22** (2004), 2954-2963.
- [105] D.M. Helfman, P. Flynn, P. Khan and A. Saeed, Tropomyosin as a regulator of cancer cell transformation, *Adv Exp Med Biol* **644** (2008), 124-131.
- [106] J.H. Leupold, H.S. Yang, N.H. Colburn, I. Asangani, S. Post and H. Allgayer, Tumor suppressor Pcd4 inhibits invasion/intravasation and regulates urokinase receptor (u- PAR) gene expression via Sp-transcription factors, *Oncogene* **26** (2007), 4550-4562.
- [107] L. Scapoli, A. Palmieri, L. Lo Muzio, F. Pezzetti, C. Rubini, A. Girardi, F. Farinella, M. Mazzotta and F. Carinci, MicroRNA expression profiling of oral carcinoma identifies new markers of tumor progression, *Int J Immunopathol Pharmacol* **23**, 1229-1234.
- [108] H. Yang, W. Kong, L. He, J.J. Zhao, J.D. O'Donnell, J. Wang, R.M. Wenham, D. Coppola, P.A. Kruk, S.V. Nicosia and J.Q. Cheng, MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN, *Cancer Res* **68** (2008), 425-433.
- [109] Z.W. Yu, L.P. Zhong, T. Ji, P. Zhang, W.T. Chen and C.P. Zhang, MicroRNAs contribute to the chemoresistance of cisplatin in tongue squamous cell carcinoma lines, *Oral Oncol* **46**, 317-322.
- [110] E. Bandres, E. Cubedo, X. Agirre, R. Malumbres, R. Zarate, N. Ramirez, A. Abajo, A. Navarro, I. Moreno, M. Monzo and J. Garcia-Foncillas, Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues, *Mol Cancer* **5** (2006), 29.
- [111] R. Ogawa, H. Ishiguro, Y. Kuwabara, M. Kimura, A. Mitsui, T. Katada, K. Harata, T. Tanaka and Y. Fujii, Expression profiling of micro-RNAs in human esophageal squamous cell carcinoma using RT-PCR, *Med Mol Morphol* **42** (2009), 102-109.

- [112] C.A. Hanson and J.R. Miller, Non-traditional roles for the Adenomatous Polyposis Coli (APC) tumor suppressor protein, *Gene* **361** (2005), 1-12.
- [113] G.A. Calin, C. Sevignani, C.D. Dumitru, T. Hyslop, E. Noch, S. Yendamuri, M. Shimizu, S. Rattan, F. Bullrich, M. Negrini and C.M. Croce, Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers, *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (2004), 2999-3004.
- [114] T.S. Wong, X.B. Liu, B.Y. Wong, R.W. Ng, A.P. Yuen and W.I. Wei, Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue, *Clin Cancer Res* **14** (2008), 2588-2592.
- [115] T. Yu, X.Y. Wang, R.G. Gong, A. Li, S. Yang, Y.T. Cao, Y.M. Wen, C.M. Wang and X.Z. Yi, The expression profile of microRNAs in a model of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced oral carcinogenesis in Syrian hamster, *J Exp Clin Cancer Res* **28** (2009), 64.
- [116] C. Welch, Y. Chen and R.L. Stallings, MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells, *Oncogene* **26** (2007), 5017-5022.
- [117] H. Tazawa, N. Tsuchiya, M. Izumiya and H. Nakagama, Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** (2007), 15472-15477.
- [118] M. Yamakuchi, M. Ferlito and C.J. Lowenstein, miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** (2008), 13421-13426.
- [119] G.T. Bommer, I. Gerin, Y. Feng, A.J. Kaczorowski, R. Kuick, R.E. Love, Y. Zhai, T.J. Giordano, Z.S. Qin, B.B. Moore, O.A. MacDougald, K.R. Cho and E.R. Fearon, p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes, *Curr Biol* **17** (2007), 1298-1307.
- [120] L. He, X. He, L.P. Lim, E. de Stanchina, Z. Xuan, Y. Liang, W. Xue, L. Zender, J. Magnus, D. Ridzon, A.L. Jackson, P.S. Linsley, C. Chen, S.W. Lowe, M.A. Cleary and G.J. Hannon, A microRNA component of the p53 tumour suppressor network, *Nature* **447** (2007), 1130-1134.
- [121] H. Hermeking, p53 enters the microRNA world, *Cancer Cell* **12** (2007), 414-418.
- [122] P.C. Ma, M.S. Tretiakova, V. Nallasura, R. Jagadeeswaran, A.N. Husain and R. Salgia, Downstream signalling and specific inhibition of c-MET/HGF pathway in small cell lung cancer: implications for tumour invasion, *Br J Cancer* **97** (2007), 368-377.

- [123] N. Yang, S. Kaur, S. Volinia, J. Greshock, H. Lassus, K. Hasegawa, S. Liang, A. Leminen, S. Deng, L. Smith, C.N. Johnstone, X.M. Chen, C.G. Liu, Q. Huang, D. Katsaros, G.A. Calin, B.L. Weber, R. Butzow, C.M. Croce, G. Coukos and L. Zhang, MicroRNA microarray identifies Let-7i as a novel biomarker and therapeutic target in human epithelial ovarian cancer, *Cancer Res* **68** (2008), 10307-10314.
- [124] A. Jakymiw, R.S. Patel, N. Deming, I. Bhattacharyya, P. Shah, R.J. Lamont, C.M. Stewart, D.M. Cohen and E.K. Chan, Overexpression of dicer as a result of reduced let-7 MicroRNA levels contributes to increased cell proliferation of oral cancer cells., *Genes Chromosomes Cancer* **49** (2010).
- [125] C.J. Chang, C.C. Hsu, C.H. Chang, L.L. Tsai, Y.C. Chang, S.W. Lu, C.H. Yu, H.S. Huang, J.J. Wang, C.H. Tsai, M.Y. Chou, C.C. Yu and F.W. Hu, Let-7d functions as novel regulator of epithelial-mesenchymal transition and chemoresistant property in oral cancer, *Oncol Rep* **26** (2011), 1003-1010.
- [126] S.S. Chang, W.W. Jiang, I. Smith, L.M. Poeta, S. Begum, C. Glazer, S. Shan, W. Westra, D. Sidransky and J.A. Califano, MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma, *Int J Cancer* **123** (2008), 2791-2797.
- [127] X. Wang, S. Tang, S.Y. Le, R. Lu, J.S. Rader, C. Meyers and Z.M. Zheng, Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth, *PLoS One* **3** (2008), e2557.
- [128] M. Raponi, L. Dossey, T. Jatkoa, X. Wu, G. Chen, H. Fan and D.G. Beer, MicroRNA classifiers for predicting prognosis of squamous cell lung cancer, *Cancer Res* **69** (2009), 5776-5783.
- [129] A.L. Gartel and E.S. Kandel, miRNAs: Little known mediators of oncogenesis, *Semin Cancer Biol* **18** (2008), 103-110.
- [130] E. Barbarotto, T.D. Schmittgen and G.A. Calin, MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile, *Int J Cancer* **122** (2008), 969-977.
- [131] N. Dahiya, C.A. Sherman-Baust, T.L. Wang, B. Davidson, M. Shih le, Y. Zhang, W. Wood, 3rd, K.G. Becker and P.J. Morin, MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer, *PLoS One* **3** (2008), e2436.
- [132] D. Bhaumik, G.K. Scott, S. Schokrpur, C.K. Patil, J. Campisi and C.C. Benz, Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells, *Oncogene* **27** (2008), 5643-5647.
- [133] R. Duan, C. Pak and P. Jin, Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA, *Hum Mol Genet* **16** (2007), 1124-1131.

- [134] B. Xu, N.H. Feng, P.C. Li, J. Tao, D. Wu, Z.D. Zhang, N. Tong, J.F. Wang, N.H. Song, W. Zhang, L.X. Hua and H.F. Wu, A functional polymorphism in Pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo, *Prostate* **70** (2010), 467-472.
- [135] H. Guo, K. Wang, G. Xiong, H. Hu, D. Wang, X. Xu, X. Guan, K. Yang and Y. Bai, A functional variant in microRNA-146a is associated with risk of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese Han, *Fam Cancer* **9**, 599-603.
- [136] Z. Liu, G. Li, S. Wei, J. Niu, A.K. El-Naggar, E.M. Sturgis and Q. Wei, Genetic variants in selected pre-microRNA genes and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck, *Cancer* **116**, 4753-4760.
- [137] J. Shen, C.B. Ambrosone, R.A. DiCioccio, K. Odunsi, S.B. Lele and H. Zhao, A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis, *Carcinogenesis* **29** (2008), 1963-1966.
- [138] C. Yue, M. Wang, B. Ding, W. Wang, S. Fu, D. Zhou, Z. Zhang and S. Han, Polymorphism of the pre-miR-146a is associated with risk of cervical cancer in a Chinese population, *Gynecol Oncol* **122**, 33-37.
- [139] P.S. Hung, K.W. Chang, S.Y. Kao, T.H. Chu, C.J. Liu and S.C. Lin, Association between the rs2910164 polymorphism in pre-mir-146a and oral carcinoma progression, *Oral Oncol*.
- [140] J. Wang, J. Bi, X. Liu, K. Li, J. Di and B. Wang, Has-miR-146a polymorphism (rs2910164) and cancer risk: a meta-analysis of 19 case-control studies, *Mol Biol Rep* **39**, 4571-4579.